



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Εκτίμηση της επίδρασης της κατανάλωσης *Sideritis scardica* Griseb. στον μεταβολισμό ενζύμων των ξενοβιοτικών CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2 και UGT1A1/1A6 σε άνδρες και γυναίκες εθελοντές

Αγορίτσα Τσιουτσιούμη

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Ευτυχία Ασπροδίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)
- Αναστάσιος Γερμενής, Καθηγητής Ανοσολογίας
- Ανδρέας Τσακάλωφ, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως μέρος των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη Φαρμακολογία

Λάρισα, Ιούλιος , 2018



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS

Estimation of the effect of *Sideritis scardica* Griseb. on enzyme metabolism of xenobiotics CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2 and UGT1A1 / 1A6 in male and female volunteers

By
Agoritsa Tsioutsioumi

Three-member Supervisory Committee:

- Eftihia Asproдини, Associate Professor of Pharmacology (Supervisor)
- Anastasios Gerменis, Professor of Immunology
- Andreas Tsakalof, Associate Professor of Chemistry

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in Pharmacology

Larisa, July, 2018

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	10
1.1. Φαινολικές ενώσεις.....	12
1.2. Κυτόχρωμα P450	19
1.3. Οξειδάση της ζανθίνης	23
1.4. N-ακετυλοτρανσφεράση-2	23
1.5. UGT.....	25
1.6 Επίδραση φυσικών προϊόντων και φλαβονοειδών στα ένζυμα του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών	26
1.7 Σκοπός.....	31
2. Υλικά και μέθοδοι	31
2.1. Εθελοντές και πειραματικό πρωτόκολλο	31
2.2. Αναλυτική μέθοδος	34
Αντιδραστήρια και χημικές ουσίες	34
Συσκευές χρωματογραφίας	35
Χρωματογραφικές συνθήκες	35
Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων	36
Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων.....	37
Επεξεργασία των δειγμάτων σιέλου.....	37
Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων για τον προσδιορισμό της ελεύθερης παρακεταμόλης.....	38
Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων για τον προσδιορισμό ολικής παρακεταμόλης	38
2.3. Ποιοτικός έλεγχος.....	38

<i>Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης των μεταβολιτών της καφεΐνης σε ούρα</i>	<i>38</i>
<i>Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης των μεταβολιτών της καφεΐνης στο σίελο</i>	<i>39</i>
<i>Γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης της παρακεταμόλης στα ούρα</i>	<i>39</i>
<i>Ακρίβεια και επαναληψιμότητα.....</i>	<i>40</i>
<i>2.4 Στατιστική ανάλυση.....</i>	<i>44</i>
<i>3. Αποτελέσματα.....</i>	<i>45</i>
<i>3.1 CYP1A2.....</i>	<i>52</i>
<i>3.2 CYP2A6.....</i>	<i>54</i>
<i>3.3 XO.....</i>	<i>55</i>
<i>3.4 NAT2.....</i>	<i>56</i>
<i>3.5 UGT1A1/1A6.....</i>	<i>58</i>
<i>4. Συζήτηση</i>	<i>59</i>
<i>CYP1A2</i>	<i>60</i>
<i>CYP2A6.....</i>	<i>62</i>
<i>XO.....</i>	<i>63</i>
<i>NAT2.....</i>	<i>64</i>
<i>UGT1A1/1A6.....</i>	<i>64</i>
<i>5. Συμπέρασμα.....</i>	<i>65</i>
<i>6. Βιβλιογραφία</i>	<i>66</i>

Ευχαριστίες

Αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακολογίας κ. Ασπροδίνη Έφη ως Επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας και τον κ. Γερμενή Αναστάσιο Καθηγητή Ανοσολογίας και τον κ. Τσακάλωφ Ανδρέα Αναπληρωτή Καθηγητή Χημείας, ως μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής.

Ιδιαίτερα όμως, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ηλία Μπέγα, ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Φαρμακολογίας του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την συνεχή υποστήριξη και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διπλωματικής εργασίας.

Περίληψη

Εισαγωγή: Ο *Sideritis Scardica* είναι από τα πιο διαδεδομένα βότανα γνωστός για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. Ο *Sideritis Scardica* χρησιμοποιείται παραδοσιακά ως τσάι βοτάνων με θεραπευτικές ενδείξεις για βήχα, φλεγμονές και γαστρεντερικές διαταραχές. Σε μελέτες *in vitro* και *in vivo* που έχουν διεξαχθεί στο παρελθόν, έχει φανεί ότι η δραστηριότητα των ενζύμων της Φάσης I και Φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών επηρεάζεται από υδατικά εκχυλίσματα διαφόρων βοτάνων. Ωστόσο, δεν έχει διενεργηθεί αντίστοιχη *in vivo* μελέτη για την επίδραση που έχει το αφέψημα του *Sideritis Scardica* στη δραστηριότητα των ενζύμων αυτών στον ανθρώπινο οργανισμό. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του αφεψήματος του *Sideritis Scardica* στην δραστηριότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2 και UGT1A1/1A6 με την χρήση της καφεΐνης και της παρακεταμόλης ως φαρμάκων-δεικτών.

Μέθοδοι: Το δείγμα μελέτης ήταν 15 υγιείς εθελοντές, οι οποίοι απείχαν από τροφές και φάρμακα που επιδρούν στα ανωτέρω ένζυμα για 9 ημέρες, στις 6 εκ των οποίων κατανάλωσαν 8gr *Sideritis Scardica* την ημέρα με τη μορφή αφεψήματος. Οι εθελοντές έλαβαν καφεΐνη, ως φάρμακο-δείκτη της δραστηριότητας των CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2, και παρακεταμόλη, ως φάρμακο-δείκτη της δραστηριότητας του UGT1A1/1A6. Επίσης, δείγματα σιέλου και ούρων συλλέχθηκαν αμέσως πριν και μετά την περίοδο κατανάλωσης του *Sideritis Scardica*. Οι συγκεντρώσεις των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα και τον σίελο και της παρακεταμόλης στα ούρα προσδιορίστηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC). Η δραστηριότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2 προσδιορίστηκε μέσω των αντίστοιχων μεταβολικών λόγων της καφεΐνης, ενώ των UGT1A1/1A6 μέσω του ποσοστού της συζευγμένης παρακεταμόλης.

Αποτελέσματα: Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για το CYP1A2 στα ούρα μειώθηκε χωρίς στατιστική σημαντικότητα μετά την κατανάλωση του *Sideritis Scardica* ($3,87 \pm 0,65$ έναντι $3,63 \pm 0,70$; $p > 0,05$). Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για το CYP1A2 στο σίελο παρουσίασε στατιστικώς σημαντική μείωση μετά τη κατανάλωση του *Sideritis Scardica* ($0,56 \pm 0,20$ έναντι $0,44 \pm 0,10$; $p = 0,044$).

Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για το CYP2A6 στα ούρα παρουσίασε οριακή μείωση μετά την κατανάλωση του *Sideritis Scardica* ($0,77 \pm 0,08$ έναντι $0,73 \pm 0,09$; $p = 0,057$). Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για την XO στα ούρα παρέμεινε σταθερή μετά την κατανάλωση του *Sideritis Scardica* ($0,67 \pm 0,05$ έναντι $0,66 \pm 0,06$; $p > 0,05$). Παρομοίως, η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου της καφεΐνης για την NAT2 στα ούρα

παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη μετά την κατανάλωση του Sideritis Scardica ($0,27 \pm 0,18$ έναντι $0,26 \pm 0,18$; $p > 0,05$). Η μέση τιμή του δείκτη δραστηριότητας των UGT1A1/1A6, παρουσίασε αύξηση χωρίς στατιστικώς σημαντική μεταβολή, μετά την κατανάλωση του Sideritis Scardica ($0,75 \pm 0,14$ έναντι $0,81 \pm 0,12$, $p > 0,05$).

Συμπέρασμα: Η τακτική κατανάλωση αφεψημάτος Sideritis Scardica φαίνεται να αναστέλλει σε σημαντικό βαθμό την δραστηριότητα του CYP1A2 και σε μικρότερο βαθμό τη δραστηριότητα του CYP2A6. Αντίθετα, ο Sideritis Scardica δεν φαίνεται να αλληλεπιδρά με τα ένζυμα XO, NAT2 και UGT1A1/1A6. Η αναστολή των CYP1A2 και CYP2A6 είναι πιθανόν να συμβάλει στη χημειοπροστασία έναντι της καρκινογένεσης από περιβαλλοντικά προκαρκινογόνα και θέτει το αίτημα για αυξημένη προσοχή σε περίπτωση συγχορήγησης φαρμάκων τα οποία είναι υποστρώματα για το CYP1A2.

Λέξεις κλειδιά: CYP1A2, CYP2A6, Οξειδάση της ξανθίνης, NAT2, UGT1A1/UGT1A6, Sideritis scardica, χημειοπροστασία, μεταβολισμός ξενοβιοτικών.

Abstract

Introduction: Mountain tea (*Sideritis scardica*) is one of the most popular herbs, known for its medicinal properties. Traditionally, *Sideritis* is used as herbal tea with therapeutic indications for coughing, inflammation and gastric disorders. Previous in vitro and in vivo studies have shown that aqueous extracts of various herbs affect the activity of Phase I and Phase II enzymes in xenobiotic metabolism. However, there is no equivalent in vivo study of the effect of the *Sideritis* decoction on the activity of these enzymes in humans. The present study was aimed to investigate the effect of *Sideritis* decoction on the functionality of CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2 and UGT1A1/1A6 enzymes by the use of caffeine and paracetamol as probe-drugs.

Methods: The study included 15 healthy volunteers who abstained from foods and drugs that affect the above-mentioned enzymes for 9 days; on days 4th-9th, volunteers consumed 8gr of *Sideritis* decoction daily. The volunteers were administered caffeine as probe-drug for CYP1A2, CYP2A6, XO and NAT2 functionality and paracetamol as a probe-drug for UGT1A1/1A6 functionality. Saliva and urine samples were collected immediately before and after the 6-day *Sideritis* consumption period. The concentration of caffeine metabolites in saliva and urine as well as paracetamol in urine were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). CYP1A2, CYP2A6, XO and NAT2 functionality was determined by the metabolic ratios of caffeine, while the UGT1A1/1A6 functionality using the rate of conjugate paracetamol. **Results:** The mean value of caffeine metabolic ratio for CYP1A2 in urine exhibited decrease with no statistical significance after the consumption of *Sideritis* ($3,87 \pm 0,65$ versus $3,63 \pm 0,70$; $p > 0,05$). The mean value of caffeine metabolic ratio for CYP1A2 in saliva exhibited a statistically significant decrease after the consumption of *Sideritis* ($0,56 \pm 0,20$ versus $0,44 \pm 0,10$; $p = 0,044$). The mean value of caffeine metabolic ratio for CYP2A6 in urine exhibited a marginal decrease after the consumption of *Sideritis* ($0,77 \pm 0,08$ versus $0,73 \pm 0,09$; $p = 0,057$). The mean value of caffeine metabolic ratio for XO in urine exhibited remained after the consumption of mountain tea (*Sideritis*) ($0,67 \pm 0,05$ versus $0,66 \pm 0,06$; $p > 0,05$). Similarly, the mean value of caffeine metabolic ratio for NAT2 in urine remained virtually unchanged after the consumption of *Sideritis* ($0,27 \pm 0,18$ versus $0,26 \pm 0,18$; $p > 0,05$). The mean value of functionality mark (index) of UGT1A1/1A6 in urine exhibited an increase without statistically significant change after the consumption of *Sideritis* ($0,75 \pm 0,14$ versus $0,81 \pm 0,12$, $p > 0,05$).

Conclusion: Regular consumption of Sideritis decoction seems to significantly inhibit CYP1A2 activity and to a lesser extent the activity of CYP2A6. In contrast, Sideritis decoction is not likely to result in clinically significant interaction with the enzymes of the xenobiotics and detoxification metabolism XO, NAT2 and UGT1A1/1A6. Inhibition of CYP1A2 and CYP2A6 is likely to contribute to chemoprevention against carcinogenicity by environmental procarcinogens and sets in increased attention vigilance in case of concomitant use of drugs that are substrates for CYP1A2.

Key words: CYP1A2, CYP2A6, Xanthine oxidase, NAT2, UGT1A1/UGT1A6, Sideritis scardica, chemoprevention, xenobiotics metabolism.

1. Εισαγωγή

Στη σημερινή κοινωνία ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό του παγκόσμιου πληθυσμού ικανοποιεί τις βασικές ανάγκες της υγείας του με εγχώρια ή παραδοσιακά φάρμακα, με το κυριότερο μέρος της θεραπείας να περιλαμβάνει τη χρήση φυτικών εκχυλισμάτων, συχνά σε υδατικά διαλύματα. Στις φυτικές τροφές που χρησιμοποιούνται ως φάρμακα για διάφορες ασθένειες, περιλαμβάνονται και οι θεραπείες με βότανα, οι οποίες παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον. Εδώ και πολλούς αιώνες, οι άνθρωποι επεξεργάζονταν το ακατέργαστο φυτικό υλικό, ώστε να μετατραπεί και να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο. Ακόμα και σήμερα, οι πάροχοι υγείας σε Ευρώπη και Ασία συνταγογραφούν αφεψημάτα βοτάνων. Παρ'όλα αυτά, τέτοιου είδους εφαρμογές βασίζονται κατά κύριο λόγο στη λαογραφία και την παραδοσιακή ιατρική, παρά σε τεκμηριωμένες έρευνες. Ο *Sideritis scardica*, δηλαδή το τσάι του βουνού, το οποίο μελετήσαμε, συγκαταλέγεται στα πιο διαδεδομένα αφεψημάτα τα οποία παρασκευάζονται ως μονήρες συστατικό και όχι συνδυαστικά με άλλα βότανα [1].

Ο *Sideritis Scardica* είναι ένα πολυετές γηγενές φυτό της Ευρώπης, που καλλιεργείται σε πολλά μέρη του κόσμου. Το γένος Σιδερίτη απαριθμεί περισσότερα από 150 είδη που βρίσκονται κυρίως στην περιοχή της Μεσογείου. Ο *Sideritis Scardica* είναι ένα ενδημικό φυτό στη Βαλκανική χερσόνησο, παρατηρείται στη FYROM, στη Βουλγαρία, στη νοτιοδυτική Αλβανία και στην Ελλάδα. Στην Βουλγαρία αυτά τα είδη είναι απειλούμενα φυτά και συμπεριλαμβάνονται στο κόκκινο βιβλίο και προστατεύεται από την Εθνική Προστασία του Νόμου [2]. Στη Μεσογειακή λαϊκή ιατρική, υδατικά παρασκευάσματα του *Sideritis Scardica* θεωρούνται ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς και επιδρούν ευεργητικά στο έλκος του στομάχου [3]. Στη βιβλιογραφία όλες οι προηγούμενες ιδιότητες του Σιδερίτη αποδίδονται κυρίως στη περιεκτικότητα αυτού του φυτού στα φλαβονοειδή [4,5,6]. Τα είδη του Σιδερίτη χρησιμοποιούνται, κυρίως στη λαϊκή ιατρική, στις Βαλκανικές χώρες ως τσάι βοτάνων για φλεγμονές, βήχα, γαστρεντερικές διαταραχές, ως διεργετικά και για πολλούς άλλους σκοπούς. Στη Βουλγαρία, ο *Sideritis Scardica* χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της βρογχίτιδας και του βρογχικού άσματος, κοινό κρυολόγημα και πνευμονικό εμφύσημα. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα από μερικά είδη Σιδερίτη έχουν αντιβακτηριακή, αντιφλεγμονώδη, αναλγητική και αντιοξειδωτική δραστηριότητα [2].

Το Ελληνικό τσάι του βουνού ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών (*Lamiaceae*) και στο γένος *Sideritis*. Αυτοφύονται 17 περίπου είδη, σχεδόν αποκλειστικά στις ορεινές περιοχές της Ελλάδας με υψόμετρο άνω των 1.000μ. Οι φυσικοί του πληθυσμοί απαντώνται συνήθως σε

πλαγιές ηλιόλουστες, πετρώδεις, με μεγάλη κλίση. Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό στην ξηρασία και στις χαμηλές θερμοκρασίες. Είναι γνωστό από την αρχαιότητα και αναφέρεται από το Θεόφραστο (372-287 π.Χ) και τον Διοσκουρίδη (10 μ.Χ αιώνα). Το επιστημονικό του όνομα *Sideritis* (Σιδερίτης) προέρχεται από την ελληνική λέξη «σίδηρος», χάρη στην επουλωτική δράση του φυτού σε πληγές που προκαλούνταν από σιδερένια όπλα, ένω, κατά άλλους, γιατί περιέχει μεγάλη ποσότητα σιδήρου στα ροφήματα που παρασκευάζονται. [7].

Δείγματα Σιδερίτη προερχόμενα από διάφορες Βαλκανικές χώρες βρέθηκε ότι περιέχουν παράγωγα του υδροξυκινναμικού οξέος, φαινυλαιθανοειδείς γλυκοσίδες (phenylethanoid) και διάφορες γλυκοσίδες των φλαβονοειδών με κυριότερες την 7-O γλυκοσίδα της υπολαετίνης, την 7-O γλυκοσίδα της μεθυλοπολαετίνης, την 7-O γλυκοσίδα της απιγενίνης, την 7-O γλυκοσίδα της λουτεολίνης, την 7-O γλυκοσίδα της ισοσκουτελαρεΐνης, φαινυλαιθανοειδείς γλυκοσίδες, απιγεΐνη, φερουλικό οξύ, λουτεολίνη, καφεΐκό και χλωρογενικό οξύ, σε διάφορες αναλογίες, ανάλογα με το μέσο εκχύλισης [8,9,10]. Το αιθέριο έλαιο του Σιδερίτη περιέχει κυρίως α,β-πιπένιο, καρβακρόλη και διτερπένια [2,11].

1.1. Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες προέρχονται από τα φυτά αποτελούν μία ετερογενή ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών. Έχουν οριστικοποιηθεί χιλιάδες φαινολικές ενώσεις, οι οποίες έχουν ταξινομηθεί σε διάφορες ομάδες και περιλαμβάνουν φαινολικά οξέα, φλαβονοειδή, στυλβένια και λιγνάνες παρόλο που υπάρχουν πολλές υποκατηγορίες. Η πολυπλοκότητα της χημικής τους δομής διακυμαίνεται από τα απλά φαινολικά οξέα, με χαμηλό μοριακό βάρος, έως τις συμπυκνωμένες ταννίνες με περίπλοκες χημικές δομές και υψηλά μοριακά βάρη. Η ποικιλία των φαινολικών ενώσεων παρουσιάζει αύξηση από την μία, τουλάχιστον, ομάδα σακχάρου συνδεδεμένης ομοιοπολικά με τον κορμό της φαινολικής της ένωσης [12].

Αποτέλεσμα μίας μεγάλης ομάδας απλών φαινολικών οξέων τα οποία βρίσκονται κυρίως, στα δημητριακά, στα φρούτα και στα λαχανικά είναι τα παράγωγα του υδροξυκιναμμικού οξέος. Το φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το p-κουμαρικό οξύ, το χλωρογενικό οξύ, το σινοϊκό οξύ, το ροσμαρινικό οξύ και η κουρκουμίνη ανήκουν σε αυτή τη σημαντική ομάδα των φαινολικών οξέων. Στα φυτά, τα πρόδρομα μόρια των παραγώγων του υδροξυκιναμμικού οξέος είναι η φαινυλαλανίνη και η τυροσίνη. Τα παράγωγα του υδροξυκιναμμικού οξέος αποτελούν, πρόδρομα μόρια για τα στυλβένια, τις χαλκόνες, τα φλαβονοειδή, τις λιγνάνες και τις ανθοκυανίνες [13]. Οι ενώσεις αυτές παρουσιάζουν πολλές φυσιολογικές δράσεις οι οποίες αποδίδονται, κυρίως, στην παρουσία πολλαπλών υδροξυλομάδων στο μόριό τους και τις καθιστούν κατάλληλες για συλλέκτες ελευθέρων ριζών. Διάφορες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έχουν αποδείξει τις αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές, αντιαιμοπεταλιακές, ογκοκατασταλτικές, αντιδιαβητικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιαγγειογενετικές ιδιότητες των ενώσεων αυτών [14,15,16].

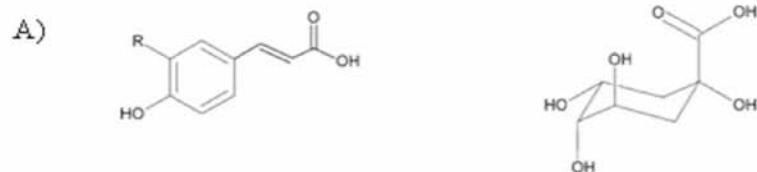
Μία κατηγορία φαινολικών ενώσεων οι οποίες χαρακτηρίζονται από την δομή της φαινυλαιθυλ αλκοόλης είναι τα φαινυλαιθανοειδή. Οι φαινυλαιθανοειδείς γλυκοσίδες είναι φυσικά προϊόντα υδατοδιαλυτά, γνωστά στο φυτικό βασίλειο και οι περισσότερες από τις οποίες έχουν απομονωθεί από παραδοσιακά φαρμακευτικά φυτά. Επίσης, αρκετές αναφορές υπάρχουν για τις σημαντικές βιολογικές δράσεις των ουσιών αυτών, μεταξύ των οποίων είναι η αναστολή ενζύμων, η αντιβακτηριδιακή, η αντιφλεγμονώδης, η αντιοξειδωτική, η νευροπροστατευτική και η κυτταροτοξική δράση [17,18,19,20].

Τα φλαβονοειδή ανήκουν σε μια σημαντική οικογένεια πολυφαινολικών ενώσεων που βρίσκονται στην φύση, και αντιπροσωπεύουν μία από τις σημαντικές τάξεις ενώσεων στα

φρούτα, στα λαχανικά, στους ξηρούς καρπούς, σε αναψυκτικά και ροφήματα όπως το τσάι, ο καφές, το κόκκινο κρασί, καθώς και σε θεραπευτικά βότανα. Έχουν οριστεί πάνω από 8.000 ενώσεις και έχουν την δομή του φλαβονοειδούς, οι οποίες δημιουργούνται από τους διάφορους συνδυασμούς των πολλαπλών υδροξυλομάδων και μεθοξυλομάδων στον βασικό σκελετό. Στις τάξεις των φλαβονοειδών περιλαμβάνονται οι φλαβόνες, οι χαλκόνες, οι φλαβανόνες, οι ανθοκυανίνες, οι φλαβονόλες, και οι ισοφλαβόνες [21].

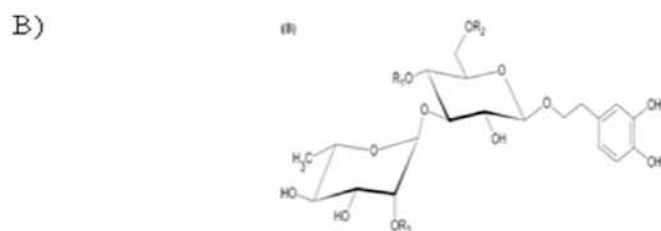
Τα φλαβονοειδή ανακαλύφθηκαν από τον Albert Szent-Gyorgyi (βραβείο Νόμπελ) τη δεκαετία του 1930, ως ενώσεις με σημαντική αντιοξειδωτική ικανότητα. Επίσης, η ικανότητά τους να δεσμεύουν υπεροξειδικές ρίζες λιπιδίων, ρίζες υδροξυλίου, και ανιόντα ριζών σουπεροξειδίου υπογραμμίζει αρκετές από τις θετικές επιδράσεις των φλαβονοειδών στον οργανισμό, οι οποίες είναι καταλυτικές στην πρόληψη ασθενειών που σχετίζονται με την οξειδωτική βλάβη που προκαλείται σε πρωτεΐνες, μεμβράνες και DNA. Επιπρόσθετα, τα φλαβονοειδή παρουσιάζουν αυξημένη αλληλεπίδραση εξειδίκευσης με ρυθμιστικά ένζυμα και υποδοχείς στους οργανισμούς. Μερικά φλαβονοειδή έχουν ισχυρούς καταστολείς στη βιοσύνθεση των προσταγλανδινών και αυτό οφείλεται κυρίως στην καταστολή της λειτουργίας ενζύμων-κλειδιών όπως η λιποξυγενάση, η κυκλοξυγενάση και η φωσφολιπάση. Μια άλλη, εξίσου σημαντική κατηγορία ενζύμων τα οποία επηρεάζονται από τα φλαβονοειδή, είναι οι πρωτεϊνικές κινάσες. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, τα φλαβονοειδή αναστέλλουν τα ένζυμα με το να ανταγωνίζονται το ATP στις θέσεις σύνδεσής του. Αυτά τα μοντέλα αναστολής διαθέτουν μια ικανοποιητική εξήγηση όσον αφορά τη μοριακή βάση της αντιφλεγμονώδους επίδρασης των φλαβονοειδών. Έτσι, τα φλαβονοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως χημειοπροστατευτικά συμπληρώματα διατροφής και να μειώσουν την εμφάνιση στεφανιαίας νόσου, ηπατικών ασθενειών, καθώς επίσης και κάποιων ειδών καρκίνου.

Έχουν βρεθεί ενώσεις με δομή φλαβονοειδών οι οποίες έχουν κυτταροτοξική δράση, και έχουν είναι επίσης γνωστοί αρκετοί μηχανισμοί με τους οποίους τα φλαβονοειδή διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταροτοξικότητα. Πολλά φλαβονοειδή έχουν αντικαρκινική ιδιότητα, όπως η μορίνη, η μυρισετίνη, η κουερσετίνη, η πινοστρομπίνη, η οποία οφείλεται στην ικανότητα τους να αναστέλλουν τις τοποϊσομεράσες I και II. Επιπλέον, τα φλαβονοειδή έχουν την δυνατότητα να προκαλέσουν μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με το να συνδέονται στον υποδοχέα οιστρογόνων. Επίσης, τα φλαβονοειδή δύνανται να ενεργοποιούν τη διαδικασία της απόπτωσης με το να επηρεάζουν καρκινικά κύτταρα. Τέλος, μερικά φλαβονοειδή εμφανίζουν αντιβακτηριακή και αντιϊκή ικανότητα, για παράδειγμα, η κουερσετίνη, η οποία αποτελεί έναν ικανοποιητικό αναστολέα της αντίστροφης μεταγραφάσης και της πρωτεάσης του HIV1 [22].

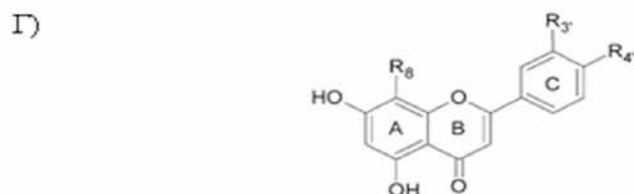


R=H: p-κουμαρικό οξύ
R=OH: καφεϊκό οξύ
R=OCH₃: φερουλικό οξύ

Κινοϊκό οξύ



Χημική ένωση	R ₁	R ₂	R ₃	MB
Εχινakoσίδη	Φερουλοϋλ	Γλυκόζη	H	786
Φορσοθοσίδη Β	Καφεοϋλ	Απιόζη	H	756
Βερμπασκοσίδη	Καφεοϋλ	H	H	724
Φορσοθοσίδη Α	Καφεοϋλ	H	H	624
Σαμιοσίδη	Καφεοϋλ	H	Απιόζη	756
Ισοβερμπασκοσίδη	H	Καφεοϋλ	H	624
Ισολευκοσεπτοσίδη	H	Φερουλοϋλ	H	638
Αλλυσονοσίδη	Φερουλοϋλ	Απιόζη	H	770
Λευκοσεπτοσίδη Α	Φερουλοϋλ	H	H	638



Χημική ένωση	R ₈	R _{3'}	R _{4'}	MB
Λουτεολίνη	H	OH	OH	286
Υπολαετίνη	OH	OH	OH	302
4-O-μεθυλπολαετίνη	OH	OH	OCH ₃	316
Απγγελίνη	H	H	OH	270
Ισοσκουτελλαρεΐνη	OH	H	OH	286
4-O-μεθυλισοσκουτελλαρεΐνη	OH	H	OCH ₃	300

Σχήμα 1: Κύριες κατηγορίες ενώσεων που απαντώνται στο *Sideritis Scardica*, A)υδροξυκυκνναμικά οξέα B) φαινυλαθανοειδείς γλυκοσίδες Γ) φλαβονοειδείς αγλυκόνες.

(Ανατύπωση από: Petreska Stanoeva J, Stefova M. Assay of urinary excretion of polyphenols after ingestion of a cup of mountain tea (*Sideritis scardica*) measured by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. Journal of agricultural and food chemistry, 2013, 6: 10488-97. [23]

Βιοδιαθεσιμότητα των φλαβονοειδών

Εύκολη απορρόφηση από το στομάχι και το έντερο, σε σύγκριση με τις υπόλοιπες πολύπλοκες φαινολικές ενώσεις έχουν τα παράγωγα του υδροξυκιναμικού οξέος. Ενώ το χλωρογενικό οξύ, το οποίο είναι εστέρας του καφεϊκού και του κινικού (quinic) οξέος, πρώτα υδρολύεται και κατόπιν το ελεύθερο καφεϊκό οξύ απορροφάται από το έντερο. Σε *in vitro* μελέτες έχει αποδεχθεί ότι στην διαδικασία απορρόφησης λαμβάνουν μέρος οι μεταφορείς μονοκαρβοξυλικών οξέων, ένα σύστημα μεταφοράς το οποίο βρίσκεται κατά μήκος των επιθηλιακών κυττάρων του εντέρου. Παρόλα αυτά, η διαδικασίας μεταφοράς μέσω νατριοεξαρτώμενου μεταφορέα και οι μηχανισμοί της παθητικής διάχυσης παίζουν, επίσης, σημαντικό ρόλο. Αρκετά παράγωγα του κινναμικού οξέος μπορούν να ανιχνευτούν στο πλάσμα αμέσως μετά την από του στόματος χορήγηση και είναι σε θέση να επιδείξουν ποικίλα οφέλη στην υγεία [13].

Στους ιστούς των φυτών τα φλαβονοειδή εμφανίζονται αποθηκευμένα κυρίως με την μορφή της σύζευξης με σάκχαρα στον C2 (χαλκόνες), στον C3 (ανθοκυανιδίνες, φλαβονόλες, και φλαβαν-3-όλες), και στον C7 (φλαβόνες, φλαβανόνες, και ισοφλαβόνες). Τα πιο κοινά συζευγμένα σάκχαρα είναι η γαλακτόζη, η ραμνόζη, η γλυκόζη, η ρουτινόζη, η αραβινοπυρανόζη, η ξυλόζη, και η αραβινοφουρανόζη [24]. Κατά την συλλογή του φυτού, των σπόρων ή των καρπών, τα φλαβονοειδή έχουν καλή σταθερότητα υπό αυτήν την συζευγμένη μορφή και διατηρούνται στις τροφές και στα ροφήματα σε υψηλή συγκέντρωση [25].

Μετά την λήψη τους, το τμήμα του σακχάρου των φλαβονοειδών διαφεύγει από τον φαινολικό κορμό και εισέρχεται στο λεπτό έντερο, όπου και απορροφώνται τα φλαβονοειδή. Με τη παθητική διάχυση διάφορα ένζυμα, όπως η β-γλυκοσιδάση, υδρολύουν τα γλυκοζυλιωμένα φλαβονοειδή και έτσι οι αγλυκόνες εισέρχονται στα επιθηλιακά κύτταρα. Τα φλαβονοειδή που είναι συζευγμένα με την ραμνόζη πρέπει να φτάσουν στο κόλον (παχύ έντερο) και να υδρολυθούν από τις α-ραμνοσιδάσες, οι οποίες εκκρίνονται από την μικροβιακή χλωρίδα, έτσι ώστε να μπορέσουν να απορροφηθούν [26]. Αφού απορροφηθούν, οι αγλυκόνες υπόκεινται σε κάποιο βαθμό σε μεταβολισμό φάσης II στα κύτταρα του εντέρου, όπως μεθυλίωση, σουλφούρωση και γλυκουρονιδίωση. Τα προϊόντα αυτά εισέρχονται μέσω της πυλαίας φλέβας στο αίμα και φτάνουν στο ήπαρ, όπου μπορεί να υποστούν περαιτέρω μεταβολισμό φάσης II (σύζευξη) και να επιστρέψουν πάλι στο αίμα μέχρις ότου να απεκκριθούν στα ούρα [27,28]. Έπειτα, κάποια προϊόντα σύζευξης στο ήπαρ εκκρίνονται ως συστατικά της χολής στο έντερο (εντεροηπατική κυκλοφορία) και οι ασύζευκτες ενώσεις

ξαναδημιουργούνται από τα μικροβιακά ένζυμα του εντέρου πριν απορροφηθούν εκ νέου. Οι μεταβολίτες που δεν απορροφώνται αποβάλλονται με τα κόπρανα. Όλοι οι παραπάνω μηχανισμοί σύζευξης είναι πολύ αποτελεσματικοί, και κατά συνέπεια οι ασύζευκτες ενώσεις είναι γενικώς απύσες ή παρούσες σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα μετά από μία διατροφική δοσολογία [29]. Παρόλο που οι ελεύθερες αγλυκόνες των φλαβονοειδών και οι Ο-μεθυλιωμένες μορφές *in vivo* υπάρχουν, ως συνδεδεμένες με γλυκουρονικό καιθειικό οξύ, πιθανότατα τα γλυκουρονίδια αυτά να μπορούν να διασπαστούν από την δράση των β-γλυκουρονιδασών οι οποίες είναι παρούσες στους ανθρώπινους ιστούς, όπως το ήπαρ ή το λεπτό έντερο ή κατά την διάρκεια τοπικών καταστάσεων φλεγμονής. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, οι ελεύθερες αγλυκόνες ή οι Ο-μεθυλιωμένες μορφές τους μπορούν να απελευθερωθούν και να ξεκινήσουν ξανά την δράση τους σε κυτταρικό επίπεδο [30].

Μηχανισμοί δράσης φλαβονοειδών

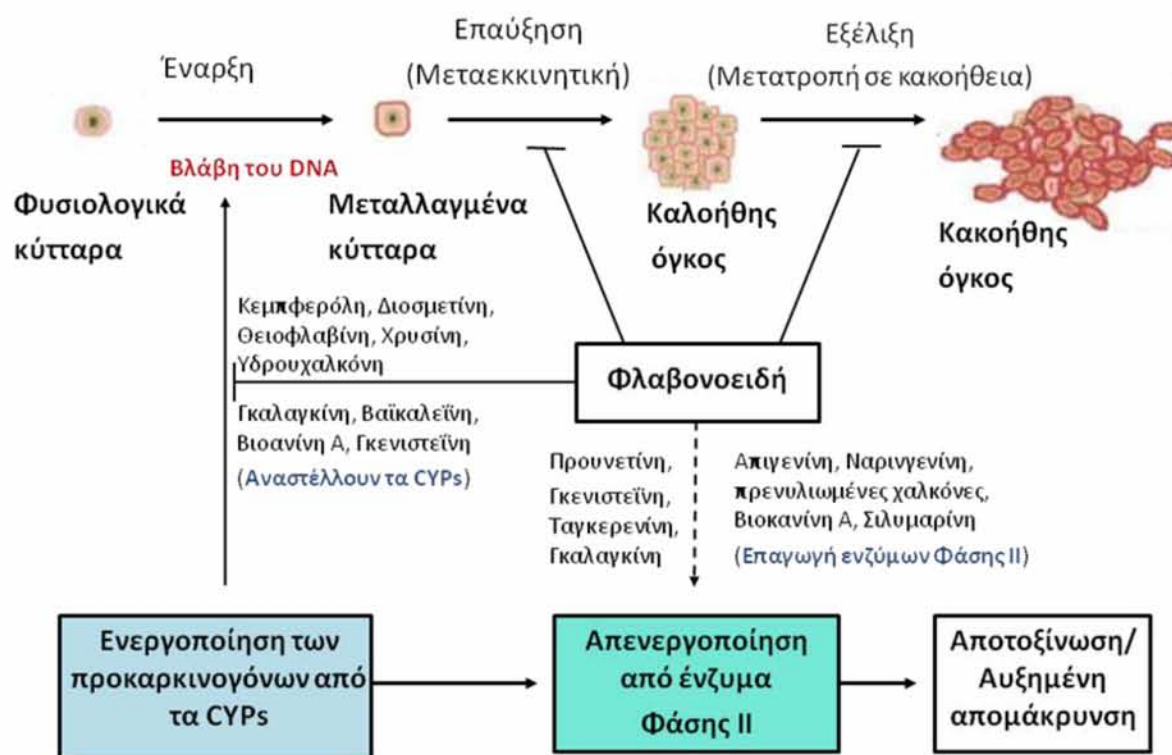
Τα φλαβονοειδή εμφανίζουν διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες, ανάλογα με την συγκέντρωσή τους. Ο μηχανισμός δράσης τους εμπλέκεται με τον υποδοχέα AhR (Arylhydrocarbon Receptor, υποδοχέας αρωματικών υδρογονανθράκων) ο οποίος είναι μεταγραφικός παράγοντας που ενεργοποιείται από προσδέτη. Σε πιο χαμηλές συγκεντρώσεις τα φλαβονοειδή λειτουργούν ως ανταγωνιστές του υποδοχέα AhR συνδεδεμένα με τον υποδοχέα, χωρίς ενεργοποίηση κάποιου μεταγραφικού παράγοντα. Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι πιθανό να λειτουργήσουν ως αγωνιστές του υποδοχέα AhR τροποποιώντας την έκφραση γονιδίων. Για παράδειγμα, ένα από τα πιο άφθονα στη φύση φλαβονοειδή, η κουερσετίνη, συνδέεται ως ανταγωνιστής του υποδοχέα AhR και αναστέλλει την μεταγραφή του mRNA και την πρωτεϊνική έκφραση του CYP1A1 η οποία επάγεται από τον πολυκυκλικό αρωματικό υδρογονάνθρακα βενζο(α)πυρένιο. Η αναστολή της δράσης αυτής έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της βλάβης του DNA από την πρόσδεση του ενεργοποιημένου από το CYP1A1 βενζο(α)πυρενίου [31].

Από πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί με μοντέλα χημικώς επαγόμενης καρκινογένεσης και με κυτταρικές σειρές, έχουν συγκεντρωθεί στοιχεία που αποδεικνύουν τις χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των φλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή εμπλέκονται στην μείωση του σχηματισμού των καρκινογόνων ουσιών, προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό από κακοήγη ογκογένεση. Η αναστολή των ενζύμων της φάσης I του μεταβολισμού, όπως τα μέλη της οικογένειας CYP1, πιθανότατα παίζει τον σημαντικότερο ρόλο. Για παράδειγμα, συγκεκριμένα φλαβονοειδή (η γκαλαγκίνη, η διοσμετίνη, η διοσμίνη) όντας αγωνιστές του υποδοχέα AhR,

αυξάνουν την έκφραση του CYP1 και, κατά συνέπεια, την δυνατότητα ενεργοποίησης των καρκινογόνων, ενώ οι ενώσεις αυτές αναστέλλουν ισχυρά τη δραστικότητα των εκφρασμένων ενζύμων. Έχει αποδειχθεί, ότι τα ανθρώπινα ένζυμα CYP1A1 και CYP1A2 μπορούν να ενεργοποιήσουν τις ετεροκυκλικές αρωματικές αμίνες των τροφών. Η αναστολή του CYP1A2 από τα φλαβονοειδή έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της μεταλλαξιογένεσης η οποία προκαλείται από τις ετεροκυκλικές αμίνες [32,22]. Απαιτούμενη για την πρόσδεση των φλαβονοειδών στο CYP1A2 είναι η παρουσία πολλαπλών υδροξυλομάδων, κατά προτίμηση 2 στις θέσεις 5- και 7- του μορίου των φλαβονών και μία επιπλέον υδροξυλομάδα στην θέση C2' των φλαβονολών [33].

Από τα φλαβονοειδή επηρεάζονται επίσης η έκφραση και η δραστικότητα και άλλων ενζύμων της υπεροικογένειας του συστήματος P450, εκτός από τα ένζυμα της οικογένειας CYP1A, όπως τα CYP1B1 [34], CYP2E1 [35], CYP3A4 [36], CYP19 [37] και ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών όπως τα UGT1A [38], GST [39], SULT [40], QR [41]. Συνεπώς, οι στρατηγικές χημειοπροστασίας μπορεί να περιλαμβάνουν την αναστολή των διαφόρων σταδίων της μεταβολικής ενεργοποίησης των προκαρκινογόνων, συνήθως από τα ένζυμα της φάσης I, καθώς και την επαγωγή των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των φαρμάκων [42], Σχήμα 1.

Οι επωφελείς επιδράσεις των φλαβονοειδών στον οργανισμό είναι πολλαπλές. Η κατανάλωση των ενώσεων αυτών (που χρησιμοποιούνται συχνά ως συμπληρώματα διατροφής) χρήζει περαιτέρω μελέτης διότι αποτελούν ξενοβιοτικές ουσίες, των οποίων η δράση εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες του οργανισμού. Δεν έχουν βρεθεί ακόμη ουσιαστικές παρενέργειες αυτών των ουσιών, ωστόσο, μερικές μπορεί να είναι σημαντικές. Έχει αποδειχθεί ότι ορισμένα φλαβονοειδή εμφανίζουν μεταλλαξιογόνες και/ή προοξειδωτικές επιδράσεις. Συμπερασματικά, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν ακόμα αρκετές μελέτες σε ζώα και μακροχρόνιες κλινικές δοκιμές, για να απαντηθεί το ερώτημα εάν τα φλαβονοειδή είναι ασφαλή για χορήγηση στον άνθρωπο, [22].



Σχήμα 1: Μηχανισμός καταστολής της καρκινογένεσης από τα φλαβονοειδή μέσω αναστολής των ενζύμων της φάσης I ή/και επαγωγής των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού (Ανατύπωση από: Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology In Vitro*, 2006, 20(2):187-210, τροποποιημένη, [21]).

Στην συγκεκριμένη εργασία η έρευνα εστιάστηκε στην μελέτη της *in vivo* επίδρασης του αφεψημάτος του Sideritis Scardica στην δραστικότητα των ανθρώπινων ενζύμων του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2 και UGT1A1/1A6.

Στην συνέχεια θα γίνει αναφορά σε μερικά γενικά στοιχεία για τα παραπάνω ένζυμα.

1.2. Κυτόχρωμα P450

Το κυτόχρωμα P450 συνιστά μία υπεροικογένεια αιμοπρωτεϊνών, η οποία αποτελεί το τελευταίο συστατικό μιας αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων προερχόμενα από το NADPH. Η υπεροικογένεια αυτή των ενζύμων είναι υπεύθυνη για τις οξειδωτικές αντιδράσεις της φάσης I του μεταβολισμού, ενός μεγάλου φάσματος δομικώς διαφορετικών υποστρωμάτων και για την κατάλυση πολλών σημαντικών ενδογενών βιοχημικών διεργασιών στα θηλαστικά [43]. Μερικές από τις αντιδράσεις που καταλύει το σύστημα αυτό είναι απαραίτητες για τη ζωή, όπως η μετατροπή της χοληστερόλης σε κορτικοειδή και φυλετικές ορμόνες, η βιοσύνθεση των χολικών οξέων, η ω-υδροξυλίωση των λιπαρών οξέων, καθώς και η βιοσύνθεση των προσταγλανδινών [44]. Διάφορες αντιδράσεις του ίδιου συστήματος είναι επίσης σημαντικές για το μεταβολισμό πολλών φαρμάκων και για την αποτοξίνωση από ουσίες ξένες προς τον οργανισμό (ξеноβιοτικές ενώσεις). Το κυτόχρωμα P450, ευθύνεται και για την *in vivo* χημική ενεργοποίηση ορισμένων από τα ισχυρότερα καρκινογόνα [45].

Το κυτόχρωμα προέρχεται από τουλάχιστον 18 διακριτές οικογένειες γονιδίων P450, οι οποίες κωδικοποιούν για 60 τουλάχιστον κυτοχρώματα P450 τα οποία εκφράζονται στους ανθρώπινους ιστούς. Οι 3 πρώτες οικογένειες (CYP1-3) βρίσκονται κατά κύριο λόγο στον μεταβολισμό εξωγενών υποστρωμάτων, όπως για παράδειγμα τα φάρμακα. Αντίθετα, οι οικογένειες CYP με μεγαλύτερους αριθμούς, συνήθως εμπλέκονται στον μεταβολισμό ενδογενών υποστρωμάτων. Τα ένζυμα CYP ευθύνονται για το 75-80% του μεταβολισμού της φάσης I και για το 65-70% της κάθαρσης των φαρμάκων τα οποία χρησιμοποιούνται στην κλινική πράξη [46].

Η οικογένεια του ανθρώπινου κυτοχρώματος CYP1 συνίσταται από τα δομικώς κυτοχρώματα CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1 τα οποία παρουσιάζουν ιστοειδική επαγωγιμότητα καθώς και ιστοειδική βασική έκφραση. Η αλληλουχία των αμινοξέων του CYP1A1 και του CYP1B1 εμφανίζει ομοιότητα με το CYP1A2 72% και 40%, αντίστοιχα. Ενώ το CYP1A1 και το CYP1A2 έχουν ευρύτερη εξειδίκευση υποστρωμάτων σε σχέση με το CYP1B1, τα 3 αυτά ένζυμα παρουσιάζουν στη δράση τους εξίσου σημαντικές αλληλεπικαλύψεις [47]. Το CYP1A2 απαντάται μόνο στο ήπαρ, το CYP1A1 στα νεφρά, στα λεμφοκύτταρα, στους πνεύμονες, στο λάρυγγα και στον πλακούντα και το CYP1B1 στην μήτρα στις ωοθήκες, στον προστάτη και στα νεφρά [47]. Το CYP1A2 αποτελεί ένα από τα πιο άφθονα ισοένζυμα του CYP στο ήπαρ, με ποσοστό υψηλότερο του 10% του συνολικού περιεχομένου σε CYP. [48].

CYP1A2

Το CYP1A2 ενεργοποιεί προκαρκινογόνα συστατικά του περιβάλλοντος και των τροφών προς καρκινογόνες ενώσεις όπως τις αρωματικές αμίνες, τις νιτροζαμίνες των αζωχρωμάτων και του καπνού των τσιγάρων, τις N-ετεροκυκλικές αμίνες οι οποίες απαντώνται στο κρέας που ψήνεται σε υψηλές θερμοκρασίες, τους πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες (PAH) οι οποίοι περιέχονται στο πετρέλαιο, στο κάρβουνο, στα αέρια των εξατμίσεων, στον καπνό του τσιγάρου, στα κρέατα που ψήνονται στα κάρβουνα [49,50] και την αφλατοξίνη B1 [51]. Παράλληλα, είναι το κύριο ένζυμο που εμπλέκεται στο μεταβολισμό φαρμάκων όπως η καφεΐνη [52], η τριαμτερένη, η ολανζαπίνη, η μελατονίνη, η φλουταμίδα, η κλοζαπίνη, η ροπιβακαΐνη, η θεοφυλλίνη και η τακρίνη [53]. Επιπρόσθετα, συμμετέχει στον μεταβολισμό της 17-β-οιστραδιόλης προς 2-OH και 4-OH μεταβολίτες [54]. Η λειτουργία του CYP1A2 επάγεται και αναστέλλεται από ποικίλους περιβαλλοντικούς και χημικούς παράγοντες, ενώ φαινοτυπικές μελέτες έχουν αναδείξει ότι η λειτουργικότητά του ρυθμίζεται από τουλάχιστον δύο μηχανισμούς: έναν μηχανισμό ο οποίος ελέγχει τα βασικά επίπεδα έκφρασης, και έναν δεύτερο ο οποίος ρυθμίζει την επαγωγιμότητα [50,55,56,57,58].

Η επαγωγή του CYP1A2 είναι περισσότερο μεταγραφική και εξαρτάται από τον υποδοχέα αρωματικών υδρογονανθράκων, AhR (Aryl hydrocarbon Receptor), όπως και από άλλους άγνωστους παράγοντες. Η διαδικασία της επαγωγής ξεκινά με τη σύνδεση ενός κατάλληλου επαγωγικού παράγοντα στον υποδοχέα AhR μέσα στο κυτταρόπλασμα και μετατόπιση του ενεργοποιημένου υποδοχέα μέσα στον πυρήνα όπου σχηματίζει διμερές με την πρωτεΐνη πυρηνικής μετατόπισης αρωματικών υδρογονανθράκων (ARNT). Έπειτα, το διμερές AhR-ARNT αλληλεπιδρά με έναν ενισχυτή αποκρινόμενο στα ξενοβιοτικά (xenobiotic-response element) στην 5' περιοχή με συνέπεια την αύξηση μεταγραφής του γονιδίου του CYP1A2, την σύνθεση του κατάλληλου m-RNA και την *de novo* σύνθεση της πρωτεΐνης του CYP1A2 [59]. Η επαγωγή μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των φαρμακολογικών δράσεων η οποία προκαλείται από αυξημένο μεταβολισμό των φαρμάκων, ή μπορεί να δημιουργήσει ανεπιθύμητη ανισορροπία μεταξύ τοξικότητας και αποτοξίνωσης. Ακόμη δεν έχει διευκρινιστεί εάν η ενεργοποίηση της οδού του υποδοχέα AhR παίζει ρόλο στην αύξηση του κινδύνου από την ενεργοποίηση των προκαρκινογόνων ή παρουσιάζει όφελος μέσω μιας πιο ταχείας αποβολής εν δυνάμει επικίνδυνων χημικών ουσιών [60].

Η επαγωγή του CYP1A2 έχει παρατηρηθεί ως αποτέλεσμα του καπνίσματος [61], της κατανάλωσης κρέατος ψημένου στα κάρβουνα ή μαγειρεμένου σε υψηλές θερμοκρασίες [62], της κατανάλωσης σταυρανθών λαχανικών όπως τα μπρόκολα, τα λαχανάκια Βρυξελλών και τα λάχανα τα οποία περιέχουν την ουσία ινδολ-3-καρβινόλη [63,64], της χρήσης φαρμάκων όπως είναι η φαινυτοΐνη, η ριφαμπικίνη και η ομεπραζόλη, καθώς και της περιβαλλοντικής έκθεσης σε πολυβρωμιωμένα διφαινύλια [47]. *In vivo* αναστολείς του CYP1A2 είναι η α-ναφθοφλαβόνη [47] και διάφορα φάρμακα όπως η φλουβοξαμίνη [65], η σιμετιδίνη [66], η βεραπαμίλη [67] και οι κινολόνες [68]. Επιπρόσθετα, η δραστηριότητα του CYP1A2 αναστέλλεται και από τον χυμό του γκρέϊπ-φρούτ [69], το αλκοόλ [70], τα αντισυλληπτικά [71] και την θεραπεία υποκατάστασης με οιστρογόνα [72]. Η αναστολή αυτή είναι αντιστρεπτή και είναι αποτέλεσμα συναγωνισμού για την ενεργό περιοχή του ενζύμου. Λιγότερη δραστηριότητα του έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς με ηπατική νόσο [73] και κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης [74], ενώ διφορούμενες είναι οι απόψεις για την επίδραση του φύλου [75,76] και της ηλικίας [77,78].

Η λειτουργικότητα του CYP1A2 έχει παρουσιάσει αρκετές διαφορές μεταξύ των ατόμων, αλλά δεν έχει βρεθεί ακόμη κάποια συσχέτιση μεταξύ του γονότυπου του ανθρώπινου CYP1A2 και του μεταβολικού φαινοτύπου του ενζύμου αυτού [79]. Παρότι που έχουν περιγραφεί περισσότερα από 40 σημεία πολυμορφισμού εντός και πλησίον του γονιδίου στον άνθρωπο [80] δεν έχει βρεθεί ακόμη εκείνη η διαφορά νουκλεοτιδίων που θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη φαινοτυπική ποικιλομορφία στο γονίδιο του CYP1A2, ούτε στην περιοχή σύνδεσης εξωνίων-ιντρονίων, ούτε στην 5'-πλευρική περιοχή του γονιδίου σε Καυκάσιους και Ασιατικούς πληθυσμούς [57,81]. Υπάρχουν, επίσης 2 σημειακές μεταλλάξεις στο ιντρόνιο-1 και μία μετάλλαξη στην 5'-πλευρική περιοχή του γονιδίου του CYP1A2 που σχετίζονται με αυξημένη ή μειωμένη δυνατότητα επαγωγής του CYP1A2 από επαγωγικούς ή ανασταλτικούς παράγοντες, αντίστοιχα [82,58,83].

Η αυξημένη δραστηριότητα του CYP1A2 συσχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του παχέος εντέρου [56], με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου της ουροδόχου κύστης [84], ενώ μειωμένη δραστηριότητα του CYP1A2 έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο του καρκίνου των όρχεων [85]. Επιπρόσθετα, η δραστηριότητα του CYP1A2 έχει παρουσίαση θετική συσχέτιση με την μαστογραφική πυκνότητα σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με αποτέλεσμα, η αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου αυτού να έχει προταθεί ως παράγων κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού [86].

CYP2A6

Το κυτόχρωμα CYP2A6 αποτελεί ένα ένζυμο της οικογενείας του γονιδίου CYP2, η οποία είναι η μεγαλύτερη οικογένεια κυτοχρώματος P450 στα θηλαστικά [48]. Επίσης συνιστά ένζυμο της φάσης I του μεταβολισμού των φαρμάκων, και μεταβολίζει περίπου το 3% των χρησιμοποιούμενων φαρμάκων όπως είναι η ταμοξιφαίνη, η κυκλοφωσφαμίδη, το βαλπροϊκό οξύ, η πιλοκαρπίνη, η προποφόλη κ.ά. [87]. Παρουσιάζεται, κυρίως, στο ήπαρ σε ποσοστό 1-10% περίπου επί του συνολικού P450 [88]. Είναι, υπεύθυνο για τη μετατροπή της νικοτίνης σε κοτινίνη [89]. Καταλύει την μεταβολική ενεργοποίηση διαφόρων προμεταλλαξιογόνων και προκαρκινογόνων όπως η αφλατοξίνη B1 και το 1,3-βουταδιένιο [90], η 3-μεθυλνιτόλη [91] και ορισμένων νιτροζαμινών του καπνού και των τροφών όπως η N-νιτροζο-διαιθυλαμίνη και η 4-(μεθυλνιτροζάμινο)-1-(3-πυριδυλ)-1-βουτανόλη [92,93]. Η λειτουργικότητά του επάγεται από διάφορα αντιεπιληπτικά φάρμακα όπως η φαινυτοΐνη, η φαινοβαρβιτάλη και η καρβαμαζεπίνη [94], ενώ το κάπνισμα φαίνεται να αναστέλλει το μεταβολισμό της νικοτίνης και της κουμαρίνης οι οποίες μεταβολίζονται κυρίως από το CYP2A6 [95]. Όσον αφορά τους *in vitro* αναστολείς του CYP2A6 αυτοί είναι η τρανυλκυπρομίνη (αντικαταθλιπτικό), το 8-μεθοξυψωραλένιο (αντιψωριασικό), και η κετοκοναζόλη (αντιμυκητιασικό), ενώ τους *in vivo* αναστολείς απαρτίζουν το 8-μεθοξυψωραλένιο και τα φλαβονοειδή που περιέχονται στο χυμό του γκρέϊπ-φρούτ [88].

Η επαγωγή του CYP2A6 διαμεσολαβείται από τον πυρηνικό υποδοχέα PXR (Pregnane X Receptor) όπου μετά την πρόσδεση του επαγωγικού παράγοντα στο κυτταρόπλασμα μεταφέρεται στον πυρήνα. Το σύμπλεγμα αυτό προστίθεται σε πυρηνικούς υποδοχείς RXR (Retinoid X Receptor) δημιουργώντας ετεροδιμερή τα οποία επιστρατεύουν ενεργοποιητές, προσδένονται σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδίου-στόχου (PXRRE) και πυροδοτούν τον μεταγραφικό μηχανισμό [96].

Η αυξημένη έκφραση του CYP2A6 σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ήπατος σε πληθυσμούς, με συχνή έκθεση σε αφλατοξίνη [97] και με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του ορθού [98].

Το γονίδιο του CYP2A6 παρουσιάζει μεγάλο πολυμορφισμό, με 40 καταγεγραμμένα αλληλόμορφα, με καίριες διαφορές μεταξύ των φυλών στον γονότυπο. Τα αλληλόμορφα CYP2A6*4 έχουν ελαττωματική λειτουργία και ευθύνονται για την αυξημένη συχνότητα (15-20%) των πτωχών μεταβολιστών μεταξύ των Ασιατών. Το αλληλόμορφο αυτό, απαντάται στους Καυκάσιους με συχνότητα 1%. Επίσης, το αλληλόμορφο CYP2A6*2 κωδικοποιεί για

ένα ένζυμο το οποίο είναι ανενεργό, επειδή αδυνατεί να ενσωματώσει τον δακτύλιο της αίμης. Η συχνότητα του αλληλομόρφου αυτού στους Καυκάσιους είναι 1-3% [90,99]. Έχει παρατηρηθεί μεγάλη ποικιλότητα στο φαινότυπο του CYP2A6 σε Καυκάσιους πληθυσμούς, όπως αυτός έχει προσδιοριστεί με τη μέτρηση των μεταβολιτών της κουμαρίνης, ενός φαρμάκου-δείκτη ειδικού για το CYP2A6, στα ούρα [88]. Η ποικιλότητα αυτή δεν ανταποκρίνεται ακριβώς στους πολυμορφισμούς του γονιδίου που έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα με συνέπεια η μέτρηση του φαινοτύπου να παραμένει σημαντικός παράγοντας για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP2A6 [98].

1.3. Οξειδάση της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης (XO) είναι ένα κυτταροπλασματικό διαλυτό ένζυμο το οποίο είναι υπεύθυνο για τον καταβολισμό των πουρινών καθώς καταλύει την υδροξυλίωση της υποξανθίνης προς ξανθίνη και της ξανθίνης προς ουρικό οξύ [100]. Εκτός από τις παραπάνω αντιδράσεις, η οξειδάση της ξανθίνης συμμετέχει και στον μεταβολισμό φαρμάκων όπως η αζαθειοπρίνη, η μερκαπτοπουρίνη και οι μεθυλοξανθίνες [101].

Στα θηλαστικά, η οξειδάση της ξανθίνης υπάρχει μαζί με την δεϋδρογονάση της ξανθίνης (XDH), οι οποίες αποτελούν τις δύο αλληλομετατρέπόμενες μορφές της οξειδοαναγωγής της ξανθίνης (XOR). Στον ανθρώπινο οργανισμό, το γονίδιο της XDH κωδικοποιεί ένα πολυπεπίτιδο αποτελούμενο από 1.333 αμινοξέα. Η XDH μπορεί μετα-μεταφραστικά, με πρωτεόλυση ή οξείδωση, να μετατραπεί, αντίστοιχα ή μη, προς οξειδάση της ξανθίνης [102]. Η οξειδάση της ξανθίνης είναι φλαβοπρωτεΐνη με μολυβδένιο και σίδηρο στο ενεργό της κέντρο [103] και μέγιστη δραστηριότητα στο έντερο και στο ήπαρ, ενώ βρίσκεται σε αφθονία και στο αγγειακό ενδοθήλιο [104,105]. Η λειτουργικότητα της οξειδάσης της ξανθίνης έχει εύρος 2-4 φορές στους ενήλικες χωρίς να είναι πολυμορφικό ένζυμο, παρόλο που ερμηνεύεται από τη συμμετοχή της σε αντιδράσεις καταβολισμού σημαντικών, για τον οργανισμό, ενδογενών ενώσεων. Παντελής έλλειψη ενεργότητας παρουσιάζεται στη σπάνια κληρονομική νόσο ξανθινουρία [101].

1.4. N-ακετυλοτρανσφεράση-2

Η N-ακετυλοτρανσφεράση-2 (NAT2) είναι ένα κυτταροπλασματικό ένζυμο το οποίο συναντάται στο ήπαρ και στην βλεννογόνο της νήστιδας και διακρίνεται από την NAT1, η οποία εκφράζεται σε όλους τους ιστούς. Η πρωτεϊνική αλληλουχία αυτών των δύο ενζύμων είναι ταυτόσημη κατά 81% [106], και τα γονίδιά τους εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 8 και

έχουν μία κωδικοποιούσα περιοχή 870 ζευγών βάσεων χωρίς ιντρόνια, στον άνθρωπο [107]. Συμμετέχουν στις αντιδράσεις της φάσης II του μεταβολισμού των φαρμάκων (σύζευξη) και καταλύουν την μεταφορά μιας ακετυλομάδας, προερχομένης από το ακετυλοσυνένζυμο-A, σε ένα άτομο αζώτου σε υποστρώματα όπως οι αρωματικές αμίνες και οι ετεροκυκλικές αμίνες σε ένα άτομο οξυγόνου σε υποστρώματα όπως οι αρυλυδροξυλαμίνες. Πιστεύεται ότι η N-ακετυλίωση συμβάλλοντας στην αποτοξίνωση, αδρανοποιεί τις ενώσεις, ενώ η O-ακετυλίωση τις ενεργοποιεί προς μεταβολίτες οι οποίοι μπορούν να επιδράσουν στο DNA και να πυροδοτήσουν την καρκινογένεση [108]. Η NAT2 ακετυλιώνει περισσότερα από 25 φάρμακα μερικά εκ των οποίων είναι η υδραλαζίνη (αντιυπερτασικό), η προκαϊναμίδη (αντιαρρυθμικό), η δαψόνη (αντιλεπρικό), η ισονιαζίδη (αντιφυματικό), οι σουλφοναμίδες (αντιμικροβιακό), η διπυρόνη (αντιφλεγμονώδες), η καφεΐνη και η κλοναζεπάμη (αντιεπιληπτικό) [109]. Γενικώς, η NAT2 θεωρείται ως ένα ένζυμο μεταβολισμού των ξενοβιοτικών, ενώ η NAT1 φαίνεται να παίζει ρόλο και στο μεταβολισμό ενδογενών ενώσεων όπως είναι το φολικό οξύ [107].

Η NAT2 είναι ένα ένζυμο πολυμορφικό και παρουσιάζει φυλετική ποικιλομορφία [110,111], η οποία οφείλεται σε μεγάλο βαθμό από γενετικούς και λιγότερο από περιβαλλοντικούς παράγοντες [112]. Έχουν οριστικοποιηθεί 107 αλληλόμορφα της NAT2 τα οποία προκύπτουν από τον συνδυασμό 43 σημειακών μεταλλάξεων. Αυτοί οι πολυμορφισμοί εκφράζονται φαινοτυπικά με τους φαινότυπους του ταχέος, του βραδέος, και πιθανώς του ενδιάμεσου μεταβολιστή [113,114].

Η κλινική σημασία του πολυμορφισμού της ακετυλίωσης έχει διερευνηθεί επαρκώς. Η χορήγηση φαρμάκων των οποίων η κάθαρση εξαρτάται, σε μεγάλο βαθμό, από την ακετυλίωση, μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητες ενέργειες σε βραδείς ακετυλιωτές, όπως περιφερική νευροπάθεια και ηπατοτοξικότητα στην περίπτωση της ισονιαζίδης, υπόταση στην περίπτωση της υδραλαζίνης, και συστηματικό ερυθρηματώδη λύκο στις περιπτώσεις της προκαϊναμίδης, της ισονιαζίδης, και της υδραλαζίνης [109].

Επιδημιολογικά, ο φαινότυπος και ο γονότυπος του βραδέος ακετυλιωτή, βρίσκεται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με καρκίνο της ουροδόχου κύστης, ειδικότερα στους καπνιστές και σε όσους εκτίθενται σε καρκινογενείς αρωματικές αμίνες λόγω επαγγέλματος [116]. Ο φαινότυπος και ο γονότυπος του ταχέος ακετυλιωτή συναντάται με αυξημένη συχνότητα σε ασθενείς με αδένωμα του παχέος εντέρου και καρκίνο και ειδικότερα σε αυτούς που καταναλώνουν κρέας παρασκευασμένο σε υψηλές θερμοκρασίες, πιθανώς λόγω της υψηλότερης έκθεσης σε καρκινογόνα ετεροκυκλικών αμινών [117,118].

1.5. UGT

Οι ουριδινο-5'-δισφωφο-γλυκουρονυλτρανφεράσες (UDP-UGTs) αποτελούν υπεροικογένεια ηπατικών μικροσωμιακών ενζύμων και είναι υπεύθυνες για την κατάλυση της σύζευξης του D-γλυκουρονικού οξέος με ένα μεγάλο εύρος ενδο- και ξενοβιοτικών περιλαμβανομένων και πολλών φαρμάκων. Η σύζευξη με το ουριδινο-δισφωφογλυκουρονικό οξύ (UDPGA) μπορεί να γίνει σε αμινοομάδα, υδροξυλομάδα, και καρβοξυλομάδα του υποστρώματος και οι μεταβολίτες που προκύπτουν αποκτούν αυξημένη διαλυτότητα στο νερό, σε σχέση με το υπόστρωμα. Ως αποτέλεσμα, οι μεταβολίτες εκκρίνονται ευκολότερα από τα νεφρά και την χολή. Ενώ η γλυκουρονιδίωση έχει ως αποτέλεσμα, συνήθως, το πέρας της φαρμακολογικής δράσης ενός φαρμάκου, μπορεί επίσης να αποτελεί στάδιο μεταβολικής ενεργοποίησης μιας ουσίας. Ειδικά, αναφέρεται ότι το 6-γλυκουρονίδιο της μορφίνης αποτελεί ένα πολύ ισχυρότερο αναλγητικό από την ίδια την μορφίνη όταν μεταφέρεται απευθείας στο κεντρικό νευρικό σύστημα [119]. Η υπεροικογένεια των UGT στον άνθρωπο, συνίσταται από 32 γονίδια και ψευδογονίδια τα οποία ομαδοποιούνται στις κατηγορίες UGT1A, UGT2A, UGT2B, UGT3A και UGT8 [120]. Οι υπεύθυνες ισομορφές για τον των ξενοβιοτικών είναι οι UGT1A και 2B οι οποίες εντοπίζονται, κατά κύριο λόγο, στο ήπαρ. Μελέτες έχουν δείξει ότι η γλυκουρονιδίωση μέσω UGT διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στην αποτοξίνωση από τις καρκινογενείς ετεροκυκλικές αμίνες οι οποίες περιέχονται σε κρέατα τα οποία έχουν μαγειρευτεί σε υψηλές θερμοκρασίες, καθώς και άλλων ξενοβιοτικών [121,122].

UGT1A1

Το ένζυμο UGT1A1 έχει μελετηθεί διεξοδικά λόγω της γενετικής του ποικιλομορφίας καθώς και για την σπουδαιότητα που έχει στον μεταβολισμό της χολερυθρίνης. Η γενετική ανεπάρκεια της UGT1A1 μπορεί να επιφέρει υπερχολερυθριναιμία, και εγκεφαλοπάθεια (kernicterus). Η ήπια υπερχολερυθριναιμία (σύνδρομο Gilbert), αποτελεί συνέπεια μίας μετάλλαξης στην περιοχή του υποκινητή (promoter) του γονιδίου της UGT1A1 [123,119]. Η UGT1A1 εμφανίζεται να έχει την μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα, μεταξύ άλλων ισομορφών, στην γλυκουρονιδίωση της ετεροκυκλικής αμίνης του καλοψημμένου κρέατος PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine) [124].

UGT1A6

Η UGT1A6 παίζει καίριο ρόλο στην γλυκουρονιδίωση επίπεδων και μικρών μορίων αρωματικών συμπεριλαμβανομένων φαρμάκων, όπως η ακεταμινοφαίνη, και δυνάμει

καρκινογόνων ενώσεων που σχετίζονται χημικά με τους πολυκυκλικούς υδροξυλιωμένους υδρογονάνθρακες. Επίσης, αναφέρεται ότι η σεροτονίνη αποτελεί ένα ενδογενές υπόστρωμα για την UGT1A6 [125,126]. Έχει αποδειχθεί ότι η UGT1A6, μεταξύ άλλων ισομορφών, είναι περισσότερο ενεργή στην αποτοξίνωση από τον αρωματικό πολυκυκλικό υδρογονάνθρακα βενζο(α)πυρένιο [127].

1.6 Επίδραση φυσικών προϊόντων και φλαβονοειδών στα ένζυμα του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών

Έχουν διενεργηθεί αρκετές *in vivo* μελέτες σε ανθρώπους και πειραματόζωα, οι οποίες έχουν διερευνήσει τις επιδράσεις φλαβονοειδών δραστικών ουσιών ή διαφόρων φυσικών προϊόντων προερχόμενες από φυσικά προϊόντα στα ένζυμα του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών. Για παράδειγμα, έχει μελετηθεί η επίδραση του γαϊδουράγκαθου (milk thistle), της πορφυρής echinacea purpurea), του σάο παλμέντο (saw palmetto) και της νεραντζιάς (citrus aurantium) σε ένζυμα του συστήματος P450 σε ανθρώπους [128], βοτανικών εκχυλισμάτων χαμομηλιού (chamomile), μέντας (peppermint), και τaráζακο (dandelion), σε ένζυμα της φάσης I και φάσης II του μεταβολισμού σε αρουραίους [129], της επίδρασης υδατικού διαλύματος δενδρολίβανου (rosemary) σε ένζυμα της φάσης I και φάσης II του μεταβολισμού σε αρουραίους [130], του σπαθόχορτου (St John's wort-Hypericum perforatum) σε ένζυμα του συστήματος P450 και της NAT2 σε ανθρώπους [131], της επίδρασης του χυμού γκρέιπ-φρουτ στο CYP1A2 σε ανθρώπους [132] και της επίδρασης των σελινοειδών (apiaceous) και σταυρανθών (brassica cruciferae) λαχανικών στο CYP1A2, NAT2 και στην XO σε ανθρώπους [133] και του αφεψήματος μέντας στα ένζυμα CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2, UGT1A1/1A6 σε ανθρώπους [134].

Όσον αφορά τις δραστικές ουσίες των φλαβονοειδών έχει μελετηθεί στον άνθρωπο η επίδραση της κουερσετίνης στα ένζυμα CYP1A2, CYP2A6, NAT2 και XO [135,136], της πουεραρίνης στο ένζυμο CYP1A2 [137] και της γενιστεΐνης στα ένζυμα CYP1A2, CYP2A6, NAT2 και XO [138] και της κουρκουμίνης και της πιπερίνης στα ένζυμα CYP3A, CYP2C9, UGT και SULT [139]. Σχετικά με τον *Sideritis scardica*, δεν έχουν πραγματοποιηθεί ακόμη έρευνες στις οποίες να έχει διερευνηθεί η επίδραση του αφεψήματος στα ένζυμα του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών σε ανθρώπους. Δεδομένης της έλλειψης παρόμοιων μελετών, η παρούσα εργασία αποπειράται να διερευνήσει την *in vivo* δραστικότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, NAT2, XO και UGT1A1/1A6 μετά από κατανάλωση αφεψήματος *Sideritis scardica*

από υγιείς εθελοντές. Για τον σκοπό αυτό, ως φάρμακα-δείκτες (probe-drugs) της ενζυμικής δραστηριότητας, χρησιμοποιήθηκαν η καφεΐνη και η παρακεταμόλη.

Η καφεΐνη (1,3,7-τριμεθυλοξανθίνη, 137MX) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως ως φάρμακο-δείκτης για τον *in vivo* προσδιορισμό της δραστηριότητας του CYP1A2, του CYP2A6, της XO και της NAT2 σε διάφορα βιολογικά υγρά, όπως ο σίελος, τα ούρα, και το πλάσμα [140,61,141,142,143,144,134]. Αυτό οφείλεται σε δύο παράγοντες: στην ασφάλεια που παρέχει η χρήση της στις συνήθειες δόσεις και στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του μεταβολισμού της στον άνθρωπο. *In vivo* [145] και *in vitro* [146,52] μελέτες έδειξαν ότι η καφεΐνη αποβάλλεται, κυρίως, μέσω N-3 απομεθυλίωσης προς 1,7-διμεθυλοξανθίνη (17MX, παραξανθίνη; Σχήμα 2). Όταν λαμβάνονται υπ' όψιν μόνο οι μεταβολικές οδοί της απομεθυλίωσης, τότε η παραπάνω αντίδραση ευθύνεται για το 83% της πρωτογενούς απομεθυλίωσης της καφεΐνης. Η N-1 απομεθυλίωση, με προϊόν την 3,7-διμεθυλοξανθίνη (37MX, θεοβρωμίνη) και η N-7 απομεθυλίωση με προϊόν την 1,3-διμεθυλοξανθίνη (13MX, θεοφυλλίνη), ευθύνονται για το 11-12% και 4-5%, αντίστοιχα, των τριών πρωτογενών απομεθυλίωσεων της καφεΐνης [147]. Η ηπατική N-3 απομεθυλίωση της καφεΐνης καταλύεται, αποκλειστικά από το CYP1A2 [52]. Επιπρόσθετα, το CYP1A2 συμμετέχει τόσο στις N-1 όσο και N-7 απομεθυλίώσεις. Με αυτόν τον τρόπο, το CYP1A2 ευθύνεται για περισσότερο από το 95% του πρωτογενούς μεταβολισμού της καφεΐνης ενώ ένα μικρό ποσοστό των N-1 και N-7 απομεθυλίωσεων δεν μπορεί να αποδοθεί στην δραστηριότητα του CYP1A2 και αποδίδεται στην καταλυτική δράση των κυτοχρωμάτων CYP2E1, CYP2C8/9 και CYP3A4 [146,52].

Έπειτα, η 17MX υδροξυλιώνεται 1,7-διμεθυλουρικό οξύ (17MU) από το CYP2A6 και από το CYP1A2 [147] και απομεθυλιώνεται προς 1-μεθυλοξανθίνη (1MX) από το CYP1A2. Έτσι, η 17MX αποτελεί τόσο προϊόν όσο και υπόστρωμα για το ένζυμο. Η περαιτέρω διάσπαση της 1MX περιλαμβάνει την 8-υδροξυλίωσή της προς 1-μεθυλουρικό οξύ (1MU) από την οξειδάση της ξανθίνης (XO) με την συμμετοχή του CYP1A [148]. Η 7-απομεθυλίωση της 17X συνεχίζεται μέσω του σχηματισμού ενός ασταθούς ενδιάμεσου με ανοιχτό δακτύλιο το οποίο σταθεροποιείται, είτε με ακετυλίωση, ως AFMU, είτε με εσωτερική επαναδιάταξη που οδηγεί προς 1X. Η ακετυλίωση αυτή συμβαίνει από το πολυμορφικό ένζυμο NAT2 ([149,150], Σχήμα 2).

Με βάση τον μεταβολισμό της καφεΐνης, έχουν προταθεί διάφοροι μεταβολικοί λόγοι (κλάσματα) των συγκεντρώσεων των μεταβολιτών, οι οποίοι αντανakλούν την δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στον πρωτογενή και δευτερογενή μεταβολισμό της, σε διάφορα βιολογικά υγρά. Όσον αφορά το πλάσμα και τον σίελο, ο μεταβολικός λόγος 17MX/137MX

αντιπροσωπεύει την δραστικότητα του CYP1A2 [151] και για τα ούρα, οι παρακάτω μεταβολικοί λόγοι έχουν προταθεί ως οι πλέον έγκυροι για την αποτύπωση της δραστικότητας των αντίστοιχων ενζύμων και χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη εργασία:

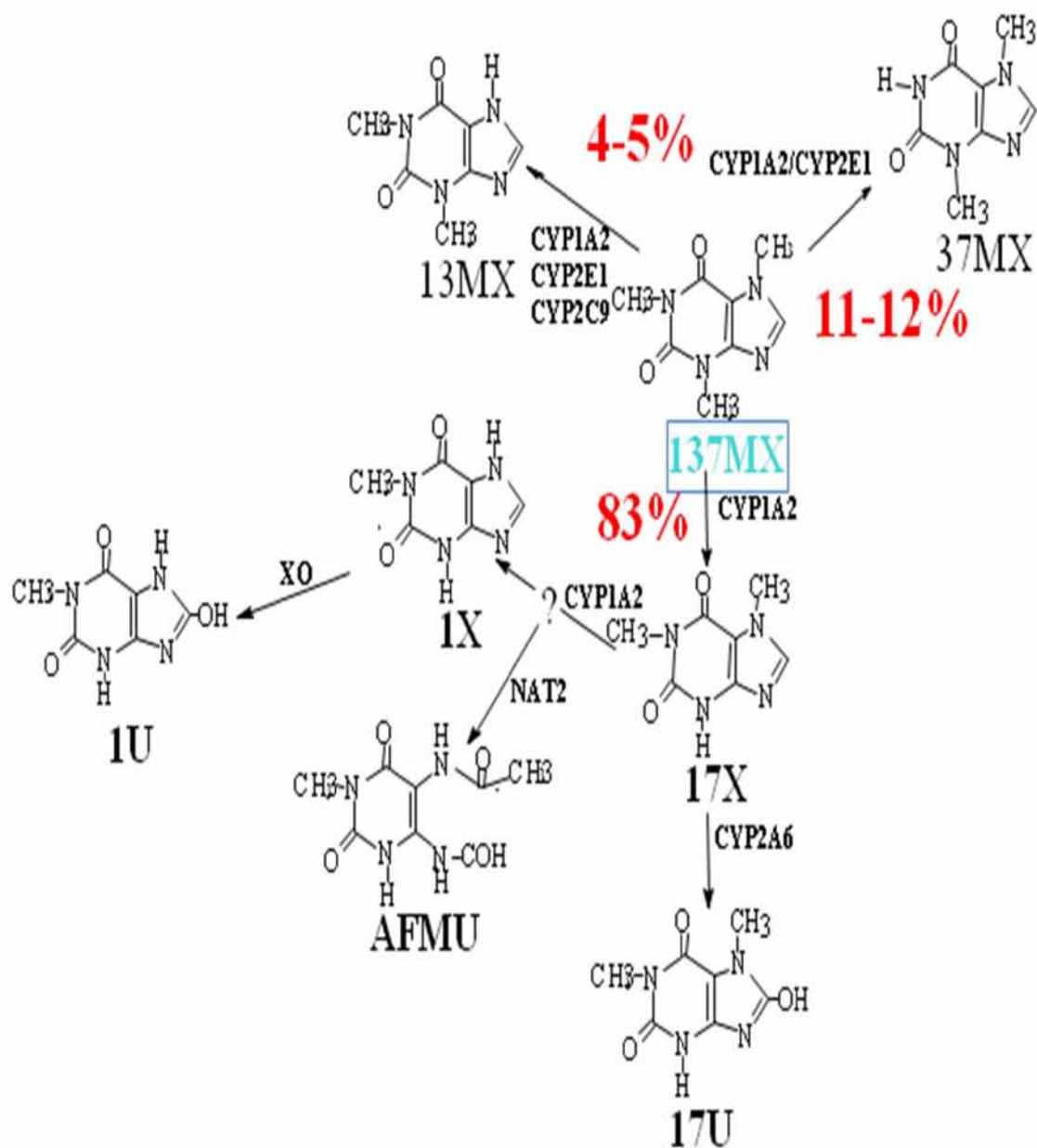
α) $(AFMU+1MU+1MX)/17MU$ για το CYP1A2 [152]

β) $1MU/(1MU+1MX)$ για την XO [75]

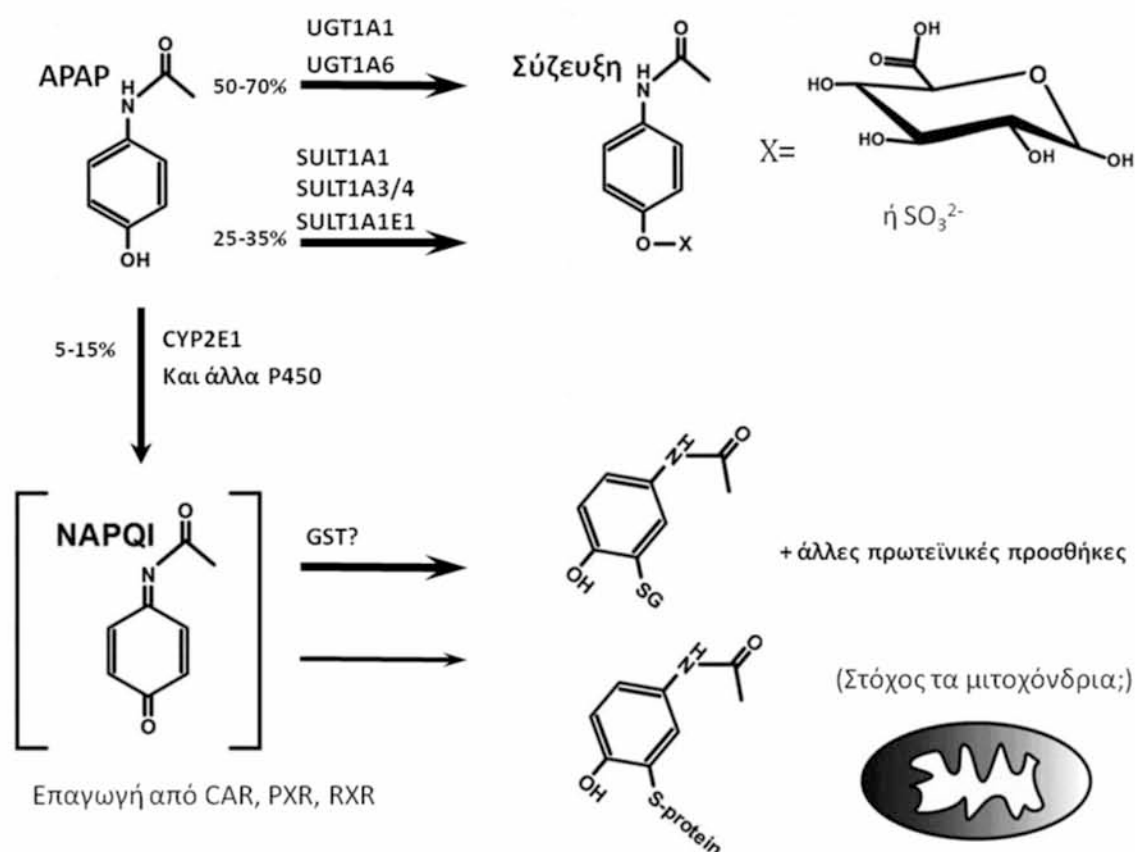
γ) $17MU/17MX$ για το CYP2A6 [98]

δ) $AFMU/(AFMU+1MU+1MX)$ για την NAT2 [153]

Η παρακεταμόλη (ακεταμινοφαίνη), ένα ευρέως διαδεδομένο αναλγητικό και αντιπυρετικό φάρμακο, έχει τις προϋποθέσεις να χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο-δείκτης για την διερεύνηση της δραστικότητας των ενζύμων UGT1A1/1A6. Αποδεδειγμένα η ακεταμινοφαίνη αποβάλλεται μέσω των ούρων ως μερκαπτουρικό οξύ ή σε σύζευξη με κυστεΐνη σε ποσοστό 5-15%. Σε ένα μεγάλο ποσοστό, της τάξης του 25-35%, αποβάλλεται με τα ούρα μέσω σύζευξης μεθειϊκή ομάδα η οποία καταλύεται από τα ένζυμα σουλφονυλτρανφεράσες. Τέλος, το μεγαλύτερο ποσοστό της παρακεταμόλης, της τάξης του 50-70%, αποβάλλεται με τα ούρα μέσω σύζευξης με γλυκουρονικό οξύ η οποία καταλύεται από τα ένζυμα UGT1A1 και 1A6 ([154], Σχήμα 3). Με βάση την αντίδραση γλυκουρονιδίωσης, η δραστικότητα των ενζύμων UGT1A1/1A6 μπορεί να προσδιοριστεί από το ποσοστό της συζευγμένης με γλυκουρονικό παρακεταμόλης στα ούρα ατόμου που έχει λάβει παρακεταμόλη. Η παρακεταμόλη έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν ως φάρμακο-δείκτης για τον *in vivo* προσδιορισμό της δραστικότητας των UGT [155].



Σχήμα 2: Μεταβολισμός της καφεΐνης στον άνθρωπο και τα εμπλεκόμενα ένζυμα [52,147].



Σχήμα 3: Μεταβολισμός της παρακεταμόλης (APAP). Το φάρμακο απομακρύνεται κυρίως μέσω γλυκουρονιδίωσης και σύζευξης μεθειώκο από τα UDP-UGTs και τα SULTs αντίστοιχα. Δευτερευόντως, μέσω της επίδρασης του κυτοχρώματος P450 μετατρέπεται στον ενεργό μεταβολίτη (NAPQI). Η απομάκρυνση του μεταβολίτη γίνεται κατόπιν σύζευξης με τη γλουταθειόνη (GSH) [154].

1.7 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της *in vivo* δραστηριότητας των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, NAT2, XO και των ενζύμων UGT1A1/1A6 μετά από κατανάλωση αφεψημάτος *Sideritis scardica* από υγιείς εθελοντές.

Στην συγκεκριμένη έρευνα η καφεΐνη και η παρακεταμόλη χρησιμοποιήθηκαν ως φάρμακα-δείκτες (probe-drugs) επειδή μπορούν να χορηγηθούν με ασφάλεια σε υγιείς εθελοντές και προσφέρουν αξιοπιστία. Επιπρόσθετα, στην συγκεκριμένη έρευνα, ο προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενζύμων έγινε με βάση την παρουσία των φαρμάκων-δεικτών και των μεταβολιτών τους στα ούρα και τον σίελο, καθιστώντας την όλη διαδικασία ανώδυνη και καθ' όλα μη επεμβατική.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Εθελοντές και πειραματικό πρωτόκολλο

Στην μελέτη συμμετείχαν 15 εθελοντές οι οποίοι, βάσει του ιστορικού τους και πρόσφατων αιματολογικών και βιοχημικών εξετάσεων, ήταν υγιείς. Τα στοιχεία των εθελοντών παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Οι εθελοντές απείχαν από την λήψη φαρμάκων για τουλάχιστον επτά (7) ημέρες αλλά και κατά τη διάρκεια του πρωτοκόλλου. Στην περίπτωση υποχρεωτικής λήψης φαρμάκων δεν θα έπρεπε να περιλαμβάνονται οι εξής δραστικές ουσίες: Αλλοπουρινόλη, Βεραπαμίλη, Κενοκοναζόλη, Κινολόνες, Μικοναζόλη, Μεξιλετίνη, Παρακεταμόλη, Ομεπραζόλη, Ριφαμπικίνη, Σιμετιδίνη, Τερβιναφίνη, Φαινυτοΐνη, Φλουφοξαμίνη, Φουραφυλίνη, Ψωραλένιο. Οι γυναίκες εθελόντριες ακολούθησαν το πρωτόκολλο της μελέτης στην αρχή του κύκλου μετά την έμμηνο ρύση. Επίσης, συμπληρώθηκε ερωτηματολόγιο από τους εθελοντές όπου αναγράφονταν τα βασικά χαρακτηριστικά τους (ηλικία, ύψος, βάρος, χρήση φαρμακευτικών σκευασμάτων) τρόπος ζωής και συνήθειες (κατανάλωση αλκοόλ, κάπνισμα, επάγγελμα, έκθεση σε χημικές ουσίες). Τέλος, η συλλογή των δειγμάτων ούρων και σιέλου έγινε μετά από ενημέρωση και προφορική συγκατάθεση των ατόμων σύμφωνα με το παρακάτω πρωτόκολλο:

1) Αποχή τρεις ημέρες από τροφές που επάγουν ή αναστέλλουν την δραστηριότητα του CYP1A (λάχανο, κρεμμύδι, κουνουπίδι, μήλο, μπρόκολο, κεράσια, γκρέϊπ-φρουτ, κρέας τηγανητό και ψητό, ροφήματα από τσάι, χαμομήλι και διάφορα βότανα, αλκοόλ και μπαχαρικά). Επιπλέον, οι εθελοντές διατηρούσαν μια σταθερή δίαιτα κατά τη διάρκεια του

πρωτοκόλλου. Οι εθελοντές απείχαν από κάθε τροφή και ποτό που περιέχει μεθυλοξανθίνες για περισσότερο από 12 ώρες πριν από τη δοκιμασία, καθώς και κατά τη διάρκεια της ημέρας της δοκιμασίας.

2) Το πρωί της τέταρτης ημέρας, οι εθελοντές ούρησαν και στη συνέχεια κατανάλωσαν μια κούπα (~250 ml) ψημένου και αλεσμένου ή στιγμιαίου καφέ (μέση περιεκτικότητα σε καφεΐνη ~118 mg και ~106 mg, αντίστοιχα, Barone and Roberts, 1984) και συνέχισαν την αποχή από όλα τα παραπάνω για τις επόμενες 6 ώρες.

3) Ακριβώς 6 ώρες μετά τη λήψη του καφέ, οι εθελοντές έδωσαν δείγμα ούρων και σιέλου σε πλαστικούς ουροσυλλέκτες. Αμέσως μετά την λήψη των ούρων έγινε ρύθμιση του pH στην τιμή 3,5 με την προσθήκη διαλύματος HCl 6N, με σκοπό να μην διασπαστεί το AFMU [156]. Δείγματα του 1 ml αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι την απαιτούμενη επεξεργασία τους.

4) Αμέσως μετά τη λήψη των δειγμάτων σιέλου και ούρων οι εθελοντές κατανάλωσαν 500mg παρακεταμόλης (Depon Αναβράζοντα Δισκία, Bristol-Myers Squibb) και συνέλεξαν δείγμα ούρων μια ώρα αργότερα. Το δείγμα αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την απαιτούμενη επεξεργασία του.

5) Το βράδυ της τέταρτης ημέρας παρασκευάστηκε και καταναλώθηκε αφέψημα Sideritis Scardica με βρασμό 4 gr Sideritis Scardica σε 250 ml νερού, περίπου, για ~2'-3' και σε ηρεμία για 5'. Η λήψη του αφεψήματος πραγματοποιήθηκε πρωί και βράδυ έως και το πρωί της δέκατης ημέρας.

6) Το πρωί της δέκατης ημέρας, οι εθελοντές ούρησαν και στη συνέχεια κατανάλωσαν μια κούπα αφεψήματος Sideritis Scardica και μια κούπα καφέ. Ολοκλήρωσαν τη διαδικασία με τα ακόλουθα βήματα (3) και (4) για την τελική λήψη δειγμάτων (Σχήμα 4).

Κατά την παραλαβή τους, τα δείγματα τόσο των ούρων όσο και του σιέλου, αριθμήθηκαν με ένα κωδικό αριθμό και στην συνέχεια αναλύθηκαν χωρίς να είναι γνωστά τα δημογραφικά στοιχεία του εκάστοτε εθελοντή.

Πίνακας 1: Δημογραφικά στοιχεία των εθελοντών.

Κωδικός	Φύλο	Ηλικία	Βάρος (kg)	Ύψος (m)	BMI	Κάπνισμα
1	Γ	24	63	1,68	22,3	OXI
2	A	21	76	1,82	22,9	OXI
3	A	56	80	1,77	25,4	OXI
4	Γ	50	69	1,65	25,3	OXI
5	A	55	80	1,78	25,2	OXI
6	A	49	73	1,71	24,9	OXI
7	A	20	80	1,83	23,8	OXI
8	A	21	66	1,75	21,5	OXI
9	A	23	83	1,77	26,4	OXI
10	Γ	24	59	1,71	20,1	OXI
11	Γ	20	61	1,71	20,8	OXI
12	Γ	48	62	1,60	24,2	OXI
13	Γ	54	85	1,54	35,8	OXI
14	Γ	27	56	1,69	19,6	OXI
15	A	25	72	1,73	24,05	OXI
ΜΤ±Τ.Α.		34,46±15,07	71,00±9,47	1,71±0,08	24,22±3,85	

	Αποχή από καφεΐνη 12 ώρες πριν
	Τεστ καφεΐνης και παρακεταμόλης
	Δειγματοληψία ούρων και σιέλου
	Sideritis Scardica Gris



Σχήμα 4: Αναπαράσταση του 10ήμερου πρωτοκόλλου λήψης του αφεψήματος του Sideritis scardica.

2.1. Αναλυτική μέθοδος

Αντιδραστήρια και χημικές ουσίες

Ο Sideritis Scardica ο οποίος χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία ήταν υπό τη μορφή ξηρού προϊόντος και η προέλευσή του ήταν από τη περιοχή Καρυάς Ολύμπου (1100m υψόμετρο), νομού Λαρίσης, βιολογικής καλλιέργειας (Ολύμπου Βότανα, [157]).

Τα πρότυπα των μεταβολιτών της καφεΐνης 17MX, 1MU, 17MU, 37MX και της 4-ακεταμιδοφαινόλης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο, προμηθεύτηκε από τη Sigma (Γερμανία) και της καφεΐνης από τη Fluca (Buchs, Ελβετία). Η προμήθεια του μεταβολίτη 1MX πραγματοποιήθηκε από την εταιρία TCI (Βέλγιο), της ισοπροπανόλης από τη Fisher Scientific (M. Βρετανία), του ακετονιτρίλιου και της μεθανόλης από την εταιρία Chem-Lab (Βέλγιο), του οξικού οξέος (άνυδρο) από την εταιρία Merck (Γερμανία), του θειικού αμμωνίου και του χλωροφορμίου έγιναν από την εταιρία CARLO ERBA (Γαλλία) και του υδροχλωρικού οξέος ($\geq 37\%$) από την εταιρία Sigma-Aldrich (Γερμανία).

Το AFMU ήταν ευγενική χορηγία του κ.W.Pfleiderer (Πανεπιστήμιο Konstanz, Γερμανία). Το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη ήταν βαθμού καθαρότητας HPLC, ενώ το υδροχλωρικό οξύ, το οξικό οξύ, το χλωροφόρμιο και το θειικό αμμώνιο ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας. Το ένζυμο β-γλυκουρονιδάση προμηθεύτηκε από την εταιρεία Sigma. Το ένζυμο είναι ανασυνδυασμένο από υπερέκφραση σε στέλεχος *Escherichia coli* BL21 και δεν παρουσιάζει καθόλου δραστηριότητα σουλφατάσης. Για όλα τα στάδια της ανάλυσης χρησιμοποιήθηκε υπερκαθαρό ύδωρ, αγωγιμότητας 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Συσκευές χρωματογραφίας

Για τη χρωματογραφική ανάλυση της καφεΐνης και των μεταβολιτών της χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές χρωματογραφίας όπως η αντλία υψηλής πίεσης Marathon III (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη), ο ανιχνευτής υπεριώδους/ορατού FASMA 500 με μεταβλητό μήκος κύματος (Rigas Labs, Θεσσαλονίκη) και η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7125 (Rheodyne, California, ΗΠΑ) στην οποία ήταν συνδεδεμένοι βρόχοι σταθερού όγκου 20 μL και 50 μL . Η ανάλυση έγινε με τη χρήση χρωματογραφικής στήλης Kromasil 100 C18, διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 5 μm , μήκους 250 mm και εσωτερικής διαμέτρου 4,6 mm (Macherey-Nagel, Γερμανία). Η στήλη ήταν τοποθετημένη σε θερμοστατούμενο κλίβανο. Στην κινητή φάση περιεχόταν αέρας που απομακρυνόταν συνεχώς μέσω της εν σειρά χρήσης ενός ηλεκτρικού απαερωτή (ERC, Ιαπωνία). Η πρόσληψη και η ανάλυση των αναλογικών/ψηφιακών δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος Chrom & Spec (AmperSand Ltd, Ρωσία).

Χρωματογραφικές συνθήκες

1) Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση των μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα:

Η ανάλυση των μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Begas et al. (2007)[60].

Η κινητή φάση αποτελείται από μίγμα 0,1% οξικού οξέος/μεθανόλης/ακετονιτρίλιου σε αναλογίες όγκων 92/4/5. Η κινητή φάση διοχετεύεται με ταχύτητα 0,7 mL/min για τα πρώτα 5' της ανάλυσης και στη συνέχεια με ταχύτητα 1,1 mL/min για τα υπόλοιπα 15'. Η ανίχνευση των μεταβολιτών έγινε σε μήκος κύματος 280 nm. Η χρωματογραφική στήλη ήταν θερμοστατούμενη στους 30° C.

2) Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της καφεΐνης και της 17MX στο σίελο:

Η ανάλυση των μεταβολιτών καφεΐνης και 17MX στο σίελο έγινε με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Begas et al. (2015)[143].

Η κινητή φάση αποτελείται από μίγμα 0,1% οξικού οξέος/μεθανόλης/ακετονιτριλίου σε αναλογίες όγκων 80/20/2. Η κινητή φάση διοχετευόταν με ταχύτητα 1 mL/min. Η ανίχνευση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 273 nm. Η χρωματογραφική στήλη ήταν θερμοστατούμενη στους 30° C.

3) Χρωματογραφικές συνθήκες για την ανάλυση της παρακεταμόλης στα ούρα:

Η κινητή φάση για την ανάλυση της παρακεταμόλης στα ούρα αποτελείται από μίγμα 0,1% οξικού οξέος/μεθανόλης/ακετονιτριλίου σε αναλογίες όγκων 92/4/5. Η κινητή φάση διοχεύτηκε με ταχύτητα 1 mL/min. Η ανίχνευση των μεταβολιτών πραγματοποιήθηκε σε μήκος κύματος 280nm. Η χρωματογραφική στήλη ήταν θερμοστατούμενη στους 30° C.

Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι αντίστοιχες ουσίες οι οποίες ζυγίστηκαν σε αναλυτικό ζυγό Gibertini (Gibertini Elettronica s.r.l. – Μιλάνο, Ιταλία) ευαισθησίας 0,1 mg και κατόπιν διαλύθηκαν στην κατάλληλη ποσότητα διαλύτη.

1) Πρότυπα διαλύματα των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα:

Δημιουργήθηκε διάλυμα 17MX συγκέντρωσης 5 mM σε υπερκαθαρό νερό, ενώ τα διαλύματα των 17MU, 1MX και 1MU, ίδιας συγκέντρωσης αντίστοιχα, σε 5 mM NaOH. Τα διαλύματα του AFMU (5 mM) και του εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη, 10mM) παρασκευάστηκαν σε 0,1% οξικό οξύ. Όλα τα πυκνά διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Επίσης, παρασκευάστηκε μίγμα των παραπάνω μεταβολιτών σε συγκέντρωση 800 μM το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των κατάλληλων προτύπων διαλυμάτων σε ούρα από υγιούς ατόμου που συλλέχθηκε μετά από αποχή 4 ημερών από μεθυλοξανθίνες.

2) Πρότυπα διαλύματα της καφεΐνης και των μεταβολιτών της στο σίελο:

Δημιουργήθηκαν διαλύματα 5mM της καφεΐνης και της 17MX σε υπερκαθαρό νερό, ενώ διάλυμα ίδιας συγκέντρωσης 37MX παρασκευάστηκε σε 5 mM NaOH. Το διάλυμα του εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη) σε συγκέντρωση 66 μM παρασκευάστηκε σε υπερκαθαρό νερό. Επίσης, παρασκευάστηκε μίγμα των ανωτέρω μεταβολιτών σε συγκέντρωση 200 μM το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία των κατάλληλων προτύπων διαλυμάτων σε σίελο από υγιούς ατόμου που συλλέχθηκε μετά από αποχή 4 ημερών από μεθυλοξανθίνες.

Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων

Σε δείγμα 200μL ούρων προστέθηκαν 250 mg θειϊκού αμμωνίου με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών, 200 μL διαλύματος οξικού οξέος 0,1%, 20 μL διαλύματος εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη, 10mM) και το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη 6mL διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης, σε αναλογία όγκων 85/15, και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 60". Ακολούθησε φυγοκέντρωση του κάθε δείγματος για 2' στις 5000rpm με σκοπό την διάσπαση του δημιουργηθέντος γαλακτώματος, την κατακρήμνιση του ιζήματος και τον καλύτερο διαχωρισμό των δυο φάσεων. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός υδατικής-οργανικής φάσης με τη χρήση διαχωριστικής χοάνης και εξάτμιση της οργανικής φάσης σε ήπιο ρεύμα N₂ στους 45°C. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μL κινητής φάσης (0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, 92/4/5 v/v), αναδεύθηκε ισχυρά για 15" και φυγοκεντρήθηκε για 2' στις 5000rpm. Ολοκληρώνοντας τη διαδικασία, 20μL του δείγματος αυτού εισήχθηκαν στη χρωματογραφική στήλη. Παρασκευάστηκαν διαλύματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου μετά από ανάμιξη 200μL ούρων που δεν περιείχαν μεθυλοξανθίνες με 200μL των προτύπων μιγμάτων των 5 μεταβολιτών στις κατάλληλες συγκεντρώσεις και επεξεργάστηκαν όπως παραπάνω.

Επεξεργασία των δειγμάτων σιέλου

Τα δείγματα του σιέλου φυγοκεντρήθηκαν για 6' στις 5000 rpm. Έπειτα, λήφθηκαν 200 μL από το υπερκείμενο στα οποία προστέθηκαν 250 mg θειϊκού αμμωνίου με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Κατόπιν προστέθηκαν 100 μL διαλύματος εσωτερικού προτύπου (4-ακεταμιδοφαινόλη, 66 μM) και το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη 4 mL διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης, σε αναλογία όγκων 85/15, και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 60". Ακολούθησε φυγοκέντρωση του κάθε δείγματος για 2' στις 5000 rpm. Έγινε διαχωρισμός υδατικής-οργανικής φάσης με τη χρήση διαχωριστικής χοάνης και εξάτμιση της οργανικής φάσης σε ήπιο ρεύμα N₂ στους 45°C. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 200 μL κινητής φάσης (0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, 80/20/2 v/v) αναδεύθηκε ισχυρά για 15" και φυγοκεντρήθηκε για 2' στις 5000 rpm. Ολοκληρώνοντας τη διαδικασία, 50 μL του δείγματος αυτού εγχύθηκαν στη χρωματογραφική στήλη. Παρασκευάστηκαν διαλύματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου μετά από προσθήκη πυκνών διαλυμάτων των μεταβολιτών κατάλληλης συγκέντρωσης σε 200 μL σιέλου που δεν περιείχε μεθυλοξανθίνες και επεξεργάστηκαν όπως παραπάνω.

Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων για τον προσδιορισμό της ελεύθερης παρακεταμόλης

Μετά από 1 ώρα κατανάλωσης της παρακεταμόλης συλλέχθηκαν 200μl ούρων και προστέθηκαν 250 mg θειϊκού αμμωνίου με σκοπό την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Έπειτα, προστέθηκαν 100 μL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος συγκέντρωσης 0,1 M και pH=6,8 και το δείγμα αναδεύτηκε ισχυρά. Πραγματοποιήθηκε προσθήκη 5 mL διαλύματος χλωροφορμίου/ισοπροπανόλης, σε αναλογία όγκων 85/15 και ακολούθησε ισχυρή ανάδευση για 60". Έπειτα φυγοκεντρήθηκε κάθε δείγμα για 2' στις 5000 rpm με σκοπό την διάσπαση του δημιουργηθέντος γαλακτώματος, την κατακρήμνιση του ιζήματος και τον καλύτερο διαχωρισμό των δυο φάσεων. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός υδατικής-οργανικής φάσης με τη χρήση διαχωριστικής χοάνης και εξάτμιση της οργανικής φάσης σε ήπιο ρεύμα N₂ στους 45°C. Επαναδιαλύθηκε το στερεό υπόλειμμα σε 200 μL κινητής φάσης (0,1% οξικό οξύ/μεθανόλη/ακετονιτρίλιο, 92/4/5 v/v) αναδεύθηκε ισχυρά για 15" και φυγοκεντρήθηκε για 2' στις 5000 rpm. Ολοκληρώνοντας τη διαδικασία 20 μL του δείγματος αυτού εγχύθηκαν στη χρωματογραφική στήλη. Παρασκευάστηκαν διαλύματα βαθμονόμησης και ποιοτικού ελέγχου μετά από προσθήκη πυκνού διαλύματος της παρακεταμόλης, κατάλληλης συγκέντρωσης σε 200 μL ούρων που δεν περιείχαν παρακεταμόλη και επεξεργάστηκαν όπως παραπάνω.

Επεξεργασία των δειγμάτων ούρων για τον προσδιορισμό ολικής παρακεταμόλης

Μετά από 1 ώρα κατανάλωσης της παρακεταμόλης σε 300 μL ούρα προστέθηκαν 150 μL φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος συγκέντρωσης 0,1 M και pH=6,8 και 13 μL διαλύματος ενζύμου β-γλυκουρονιδάσης (820 IU). Αφού έγινε σύντομη ανακίνηση τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο στους 37°C για μια ώρα. Έπειτα λήφθηκαν 200 μL από το μίγμα της επώασης τα οποία εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν όπως περιγράφηκε στην παράγραφο την σχετική με τον προσδιορισμό της ελεύθερης παρακεταμόλης. Επώσεις για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα και συγκεκριμένα για 1,5 και 2 ώρες, δεν έδωσαν διαφορετικά αποτελέσματα απ' ότι η επώαση διάρκειας μιάς ώρας (τα δεδομένα αυτά δεν παρουσιάζονται).

Ο προσδιορισμός της συζευγμένης παρακεταμόλης έγινε με αφαίρεση της μετρηθείσας συγκέντρωσης της ελεύθερης παρακεταμόλης από την μετρηθείσα συγκέντρωση της ολικής παρακεταμόλης.

2.3. Ποιοτικός έλεγχος

Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης των μεταβολιτών της καφεΐνης σε ούρα

Κατασκευάστηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης με σκοπό να επιβεβαιώσουν την γραμμική συσχέτιση μεταξύ του λόγου «ύψος κορυφής μεταβολίτη/ύψος κορυφής ΕΠ» και των προκαθορισμένων συγκεντρώσεων τους σε ούρα χωρίς μεθυλοξανθίνες. Τα δείγματα βαθμονόμησης σε συγκεντρώσεις 10, 20, 50, 100, 200 και 400 μM πραγματοποιήθηκαν με την ανάμιξη ούρων που δεν περιείχαν μεθυλοξανθίνες με πρότυπα μίγματα των 5 μεταβολιτών και του εσωτερικού προτύπου, ώστε να προκύψουν οι ανωτέρω τελικές συγκεντρώσεις. Για τη βαθμονόμηση τα δείγματα ούρων που χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν με τη διαδικασία που περιγράφηκε προηγουμένως. Οι πρότυπες καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάστηκαν με τη χρήση της μεθόδου της γραμμικής παλινδρόμησης (Πίνακας 3.).

Γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης των μεταβολιτών της καφεΐνης στο σίελο

Παρομοίως με τα δείγματα ούρων, κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης των μεταβολιτών της καφεΐνης στο σίελο σε συγκεντρώσεις 0,5, 1, 2, 5, 10 και 30 μM (Πίνακας 2).

Γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης της παρακεταμόλης στα ούρα

Σύμφωνα με τα παραπάνω κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης της παρακεταμόλης σε συγκεντρώσεις 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5 και 2 μM (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: Εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης των καμπυλών βαθμονόμησης. Εξίσωση ελαχίστων τετραγώνων $y=ax+\beta$

	α	β	R^2	Εύρος συγκεντρώσεων (μM)
Μεταβολίτης καφεΐνης στα ούρα				
AFMU	0,0085	-0,0074	0,9906	10-400
1MU	0,0069	-0,0068	0,9960	10-400
1MX	0,0044	0,0101	0,9966	10-400
17MU	0,0036	0,0185	0,9990	10-400
17MX	0,0025	0,0024	0,9987	10-400
Μεταβολίτης καφεΐνης στον σίελο				
17MX	0,1121	0,0158	0,9998	0,5-30
137MX	0,1093	0,1268	0,9994	0,5-30
Παρακεταμόλη ούρων*				
	131,33	0,9530	0,9993	0,1-2,0

* οι συγκεντρώσεις της παρακεταμόλης εκφράζονται σε mM

Ακρίβεια και επαναληψιμότητα

Παρασκευάστηκαν 2 δείγματα ποιοτικού ελέγχου (Quality Control, QC) με την ανάμιξη ούρων ελευθέρων από μεθυλοξανθίνες με ένα πρότυπο διάλυμα αποτελούμενο από τους πέντε μεταβολίτες και του εσωτερικού προτύπου σε χαμηλές (30 μM) και υψηλές (300 μM) συγκεντρώσεις για το κάθε μεταβολίτη. Πριν την ημερήσια χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων ούρων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση των δύο δειγμάτων ελέγχου ποιότητας. Συνολικά αναλύθηκαν 4 δείγματα ελέγχου χαμηλών, και 4 δείγματα υψηλών συγκεντρώσεων. Η συγκέντρωση των μεταβολιτών σε κάθε δείγμα ποιοτικού ελέγχου προσδιορίστηκε μέσω των εξισώσεων των αντίστοιχων ευθειών γραμμικής παλινδρόμησης.

Με παρόμοιο τρόπο παρασκευάστηκαν δύο δείγματα ποιοτικού ελέγχου για την καφεΐνη και τους μεταβολίτες της στο σίελο σε συγκεντρώσεις 1,5 και 15 μM .

Παρομοίως παρασκευάστηκαν δύο δείγματα ποιοτικού ελέγχου για την παρακεταμόλη στα ούρα σε συγκεντρώσεις 0,15 και 1,5 mM (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Ακρίβεια και επαναληψιμότητα των μετρήσεων (n=4).

	Προστε- θείσα συγκέν- τρωση (μM)	Μέση μετρηθείσα συγκέντρω- ση	Σφάλμ α (bias%)	Συντελεστής διακύμανσης (CV%)	Προστε θείσα συγκέν- τρωση	Μετρηθείσα συγκέντρωση	Σφάλμ α (bias%)	Συντελεστής διακύμανσης (CV%)
Μεταβολίτης καφεΐνης στα ούρα								
AFMU	30,00	30,92	3,07	4,35	300,00	295,20	-1,60	4,50
1MU	30,00	32,06	6,86	11,52	300,00	299,98	-0,01	7,55
1MX	30,00	30,47	1,57	3,55	300,00	307,42	2,47	1,72
17MU	30,00	31,03	3,43	4,12	300,00	296,20	-1,27	1,95
17MX	30,00	29,10	-3,00	8,75	300,00	296,14	-1,28	2,99
Μεταβολίτης καφεΐνης στο σίελο								
17MX	1,50	1,56	4,00	4,22	15,00	14,73	-1,80	4,70
137MX	1,50	1,58	5,33	2,87	15,00	14,97	-0,20	5,61
Παρακεταμόλη ούρων*								

0,15	0,16	6,67	5,10	1,50	1,51	0,67	5,80
------	------	------	------	------	------	------	------

*οι συγκεντρώσεις της παρακεταμόλης εκφράζονται σε mM

2.4 Στατιστική ανάλυση

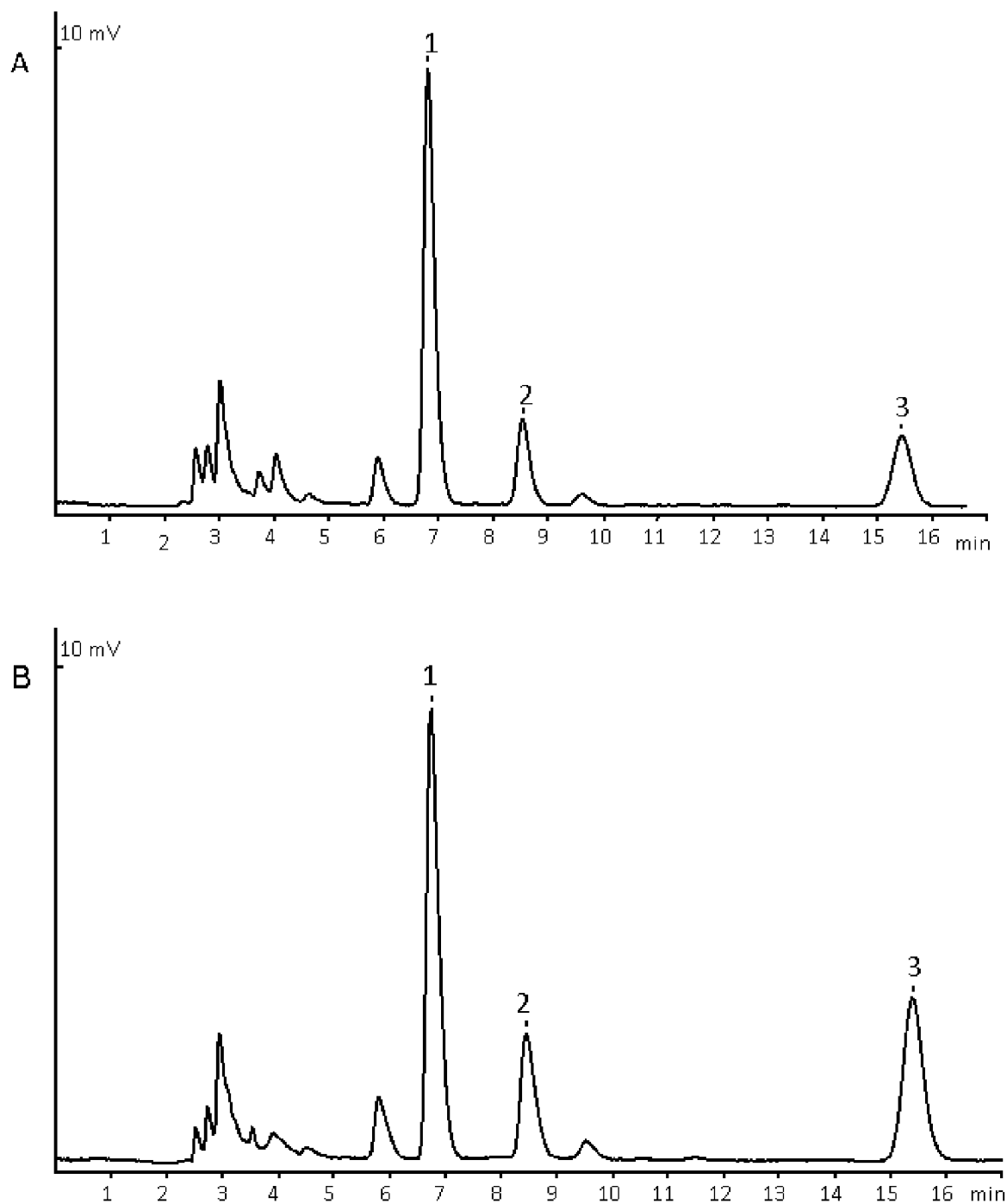
Παρουσιάστηκαν αποτελέσματα με τις μέσες τιμές και τις τυπικές αποκλίσεις των μετρήσεων των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα και τον σίελο και των μετρήσεων του κλάσματος σύζευξης της παρακεταμόλης. Η γραμμικότητα των καμπυλών βαθμονόμησης πραγματοποιήθηκε με την ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης. Οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών των μετρήσεων προ και μετά την χορήγηση του Sideritis Scardica ελέγχθηκαν με την δοκιμασία t-test για σχετιζόμενα δείγματα (paired samples t-test). Τέλος, θεωρήθηκαν οι διαφορές στατιστικά σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$ και η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το στατιστικό λογισμικό SPSS 13.0.

3. Αποτελέσματα

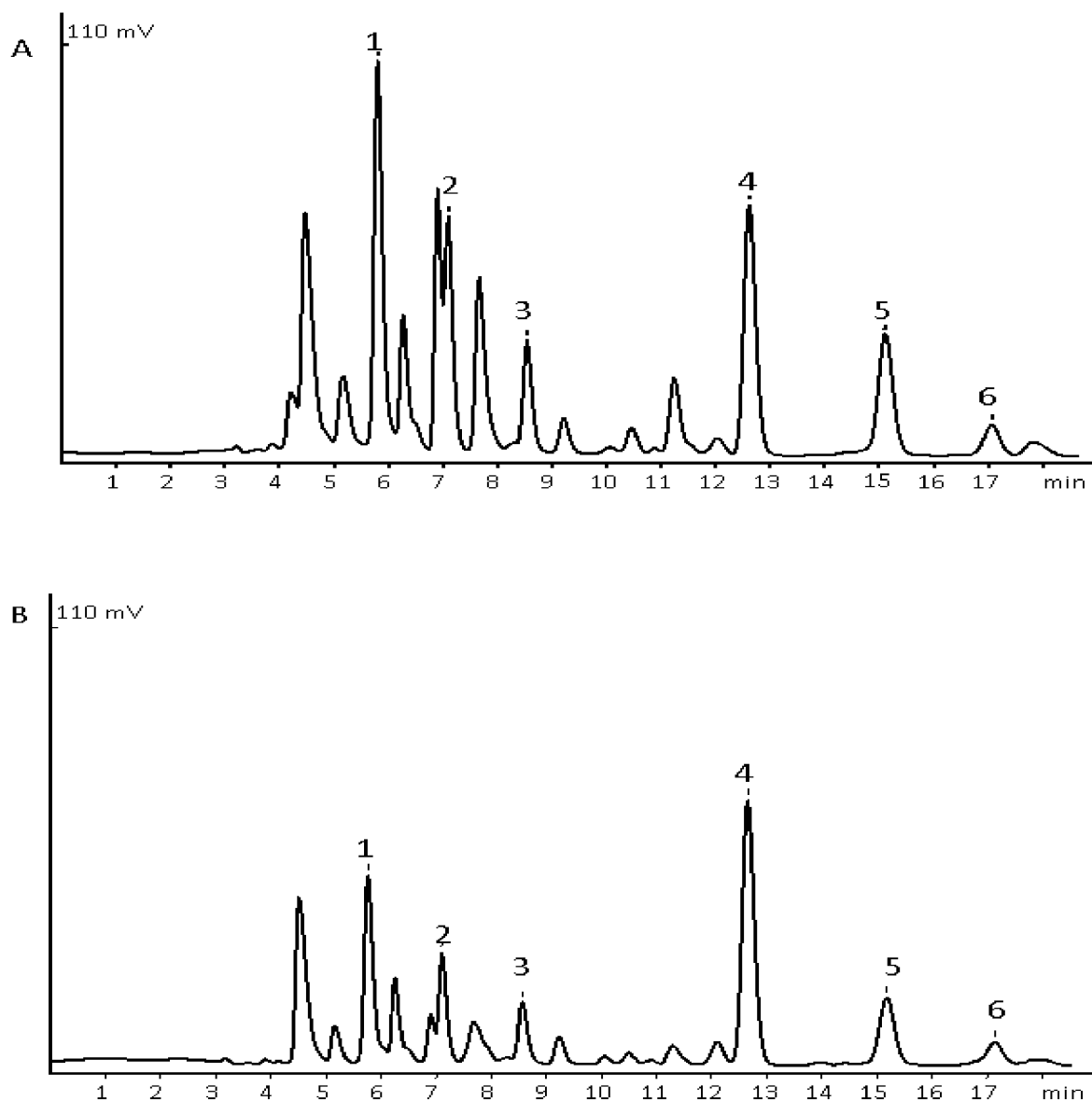
Στο Σχήμα 5 εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα HPLC των μεταβολιτών της καφεΐνης στον σίελο ενός εθελοντή 6 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης, πριν και μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος του Sideriti scardica. Στο Σχήμα 6 εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα HPLC των μεταβολιτών της καφεΐνης στα ούρα ενός εθελοντή 6 ώρες μετά την κατανάλωση της καφεΐνης, πριν και μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος του Sideriti scardica. Στο Σχήμα 7 εμφανίζονται τα χρωματογραφήματα HPLC της ελεύθερης και της ολικής παρακεταμόλης στα ούρα εθελοντή πριν και μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψήματος του Sideriti scardica.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των τιμών των μεταβολικών λόγων $(AFMU+1MU+1MX)/17MU$, $17MU/(17MU+17MX)$, $17U/(17U+17X)$ και $AFMU/(AFMU+1MU+1MX)$ της καφεΐνης στα ούρα οι οποίοι αντανakλούν την δραστικότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2, αντίστοιχα, και του μεταβολικού λόγου $17MX/137MX$ στον σίελο, ο οποίος αντανakλά την δραστικότητα του CYP1A2, εμφανίζονται στον Πίνακα 4.

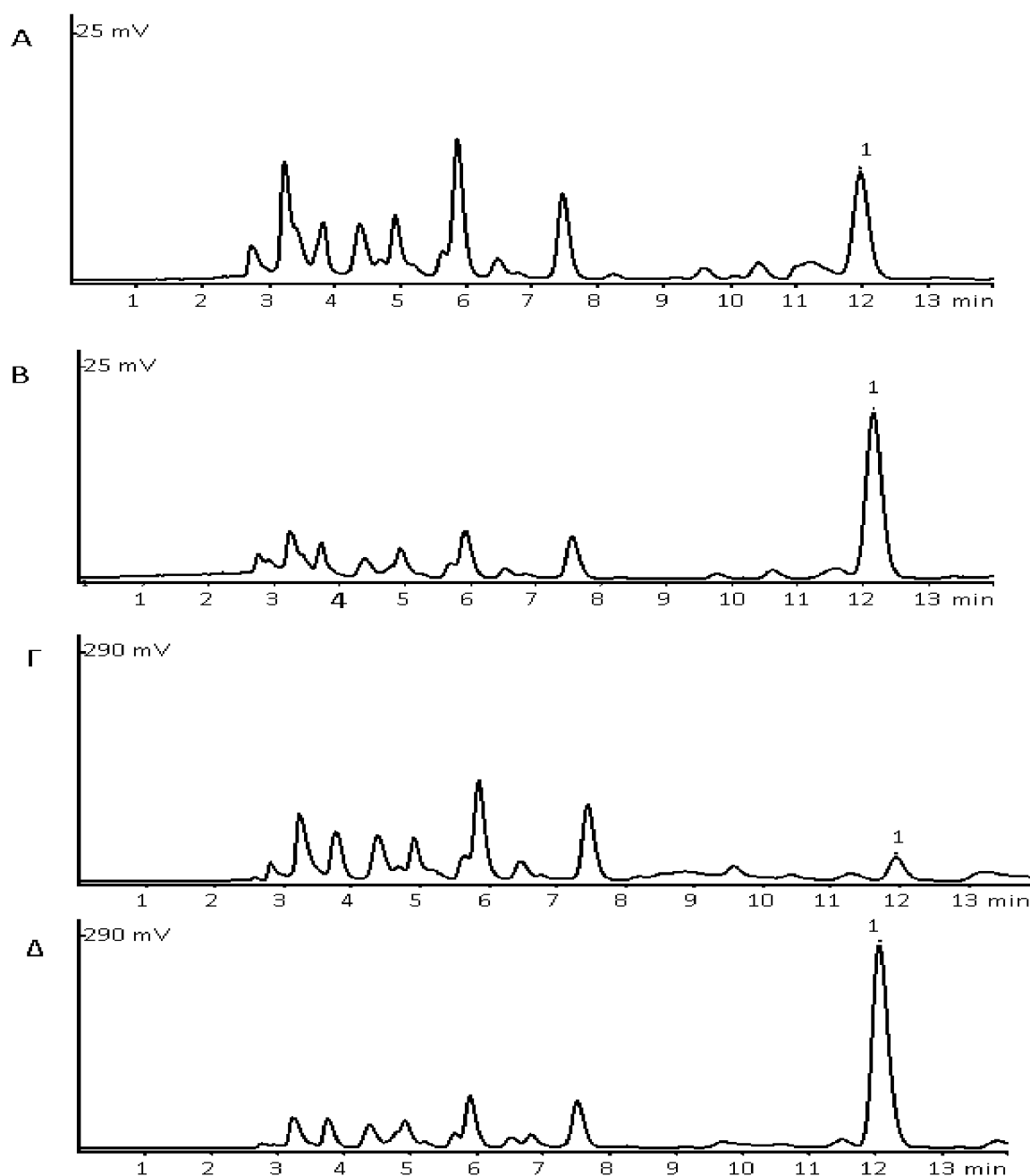
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της ελεύθερης και της ολικής παρακεταμόλης καθώς και το κλάσμα σύζευξης (ποσοστό σύζευξης) με γλυκουρονικό στα ούρα των εθελοντών εμφανίζονται στον Πίνακα 5.



Σχήμα 5: Χρωματογραφήματα HPLC των μεταβολιτών της καφεΐνης στο σίελο. **A:** πριν τη λήψη του *Sideritis scardica*, δείκτης δραστικότητας CYP1A2= 1,15. **B:** Μετά τη λήψη του *Sideritis scardica*, δείκτης δραστικότητας CYP1A2=0,55. 1=ΕΠ, 2= 17MX, 3=137MX.



Σχήμα 6: Χρωματογραφήματα HPLC μεταβολιτών καφεΐνης στα ούρα. **A:** πριν τη λήψη του *Sideritis scardica*, δείκτες δραστικότητας CYP1A2=4,11, CYP2A6=0,80, XO=0,68 και NAT2=0,41. **B:** Μετά τη λήψη του *Sideritis scardica*, δείκτες δραστικότητας CYP1A2=3,59, CYP2A6=0,75, XO=0,64 και NAT2=0,37. 1= AFMU, 2= 1MU, 3= 1MX, 4= ΕΠ, 5= 17MU, 6= 17MX.



Σχήμα 7: Χρωματογραφήματα HPLC ούρων μετά την κατανάλωση της παρακεταμόλης. **A:** ελεύθερη παρακεταμόλη πριν τη χορήγηση του *Sideritis scardica* [Παρακεταμόλη]=0,14 mM. **B:** ολική παρακεταμόλη πριν τη χορήγηση του *Sideritis scardica* [Παρακεταμόλη]=0,38 mM. Κλάσμα σύζευξης με γλυκουρονικό 0,65 **Γ:** ελεύθερη παρακεταμόλη μετά τη χορήγηση του *Sideritis scardica* [Παρακεταμόλη]=0,37 mM. **Δ:** ολική παρακεταμόλη μετά τη χορήγηση του *Sideritis scardica* [Παρακεταμόλη]=5,37 mM. Κλάσμα σύζευξης με γλυκουρονικό 0,93.

Πίνακας 4: Τιμές των μεταβολικών λόγων της καφεΐνης στα ούρα και στο σίελο που αντανακλούν τη δραστηριότητα των CYP1A2, CYP2A6, XO και NAT2.

Κωδ.	Δείκτης CYP1A2†		Δείκτης CYP2A6†		Δείκτης XO†		Δείκτης NAT2†		Δείκτης CYP1A2‡	
	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ
1	4,22	4,05	0,85	0,79	0,73	0,69	0,57	0,53	1,15	0,55
2	3,19	3,61	0,84	0,84	0,66	0,66	0,37	0,34	0,70	0,09
3	4,64	3,58	0,82	0,69	0,71	0,71	0,43	0,46	0,58	0,30
4	4,11	3,59	0,80	0,75	0,68	0,64	0,41	0,37	0,63	0,54
5	4,11	4,83	0,65	0,58	0,73	0,74	0,52	0,53	0,52	0,48
6	4,90	4,26	0,70	0,72	0,67	0,68	0,42	0,42	0,73	0,53
7	4,18	2,73	0,84	0,74	0,71	0,66	0,06	0,06	0,43	0,38
8	3,72	3,18	0,74	0,64	0,66	0,69	0,35	0,32	0,49	0,34
9	2,28	2,56	0,73	0,60	0,62	0,65	0,14	0,13	0,36	0,54
10	3,54	4,20	0,79	0,83	0,61	0,52	0,07	0,05	0,65	0,41
11	3,94	4,80	0,58	0,64	0,68	0,65	0,11	0,08	0,29	0,38
12	3,46	3,15	0,73	0,77	0,56	0,57	0,11	0,11	0,55	0,42
13	3,52	3,25	0,83	0,83	0,67	0,67	0,10	0,10	0,42	0,47
14	4,53	3,72	0,78	0,82	0,68	0,72	0,06	0,08	0,48	0,45
15	3,64	2,89	0,86	0,75	0,69	0,64	0,37	0,26	0,46	0,58
MT	3,87	3,63	0,77	0,73*	0,67	0,66	0,27	0,26	0,56	0,43**
±T.A.	0,65	0,70	0,08	0,09	0,05	0,06	0,18	0,18	0,20	0,13

† † Δείκτες στα ούρα: $CYP1A2 = (AFMU + 1MU + 1MX) / 17MU$,
 $CYP2A6 = 17MU / (17MU + 17MX)$, $XO = 1MU / (1MU + 1MX)$,
 $NAT2 = AFMU / (AFMU + 1MU + 1MX)$. ‡ Δείκτης $CYP1A2$ στον σίελο: $17MX / 137MX$.
 * $p=0.057$, ** $p=0,045$ σε σχέση με την περίοδο πριν την κατανάλωση του *Sideritis scardica*, t-
 test για σχετιζόμενα δείγματα.

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις παρακεταμόλης στα ούρα και το κλάσμα σύζευξης πριν και μετά τη κατανάλωση του *Sideritis scardica*.

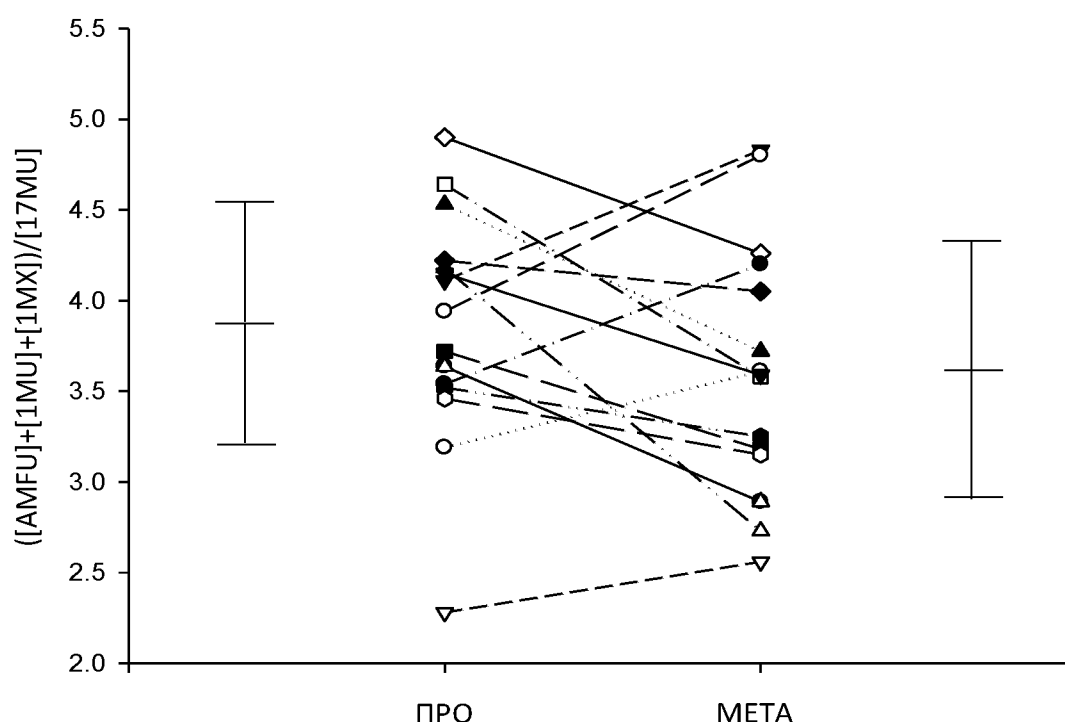
Κωδ.	[παρακεταμόλη] (mM) ΠΡΟ			[παρακεταμόλη] (mM) ΜΕΤΑ			Κλάσμα σύζευξης σύζευγμένη/ολική	
	Ελεύθερη	Ολική	Συζευγ- μένα	Ελεύθερη	Ολική	Συζευγ- μένα	ΠΡΟ	ΜΕΤΑ
1	0,48	3,42	2,94	0,34	3,09	2,74	0,86	0,89
2	0,03	0,11	0,08	0,03	0,17	0,14	0,70	0,82
3	0,34	2,32	1,98	0,01	0,60	0,59	0,85	0,98
4	0,15	2,82	2,67	0,13	1,77	1,65	0,95	0,93
5	0,31	1,01	0,70	0,49	1,57	1,08	0,69	0,69
6	0,09	0,44	0,35	0,20	1,64	1,44	0,79	0,88
8	0,12	0,33	0,22	0,12	0,29	0,18	0,65	0,60
9	0,18	1,14	0,96	0,28	1,38	1,10	0,84	0,79
10	0,02	0,06	0,03	0,06	0,14	0,08	0,59	0,59
11	0,06	0,17	0,10	0,19	0,72	0,53	0,61	0,74
12	0,14	0,38	0,24	0,37	5,37	4,99	0,65	0,93
13	0,63	3,47	2,84	0,24	1,70	1,46	0,82	0,86
14	0,34	4,06	3,72	0,40	1,68	1,28	0,92	0,76
15	0,09	0,17	0,08	0,09	1,89	1,80	0,49	0,95
M.T							0,75	0,81
±T.A							0,14	0,12

CYP1A2

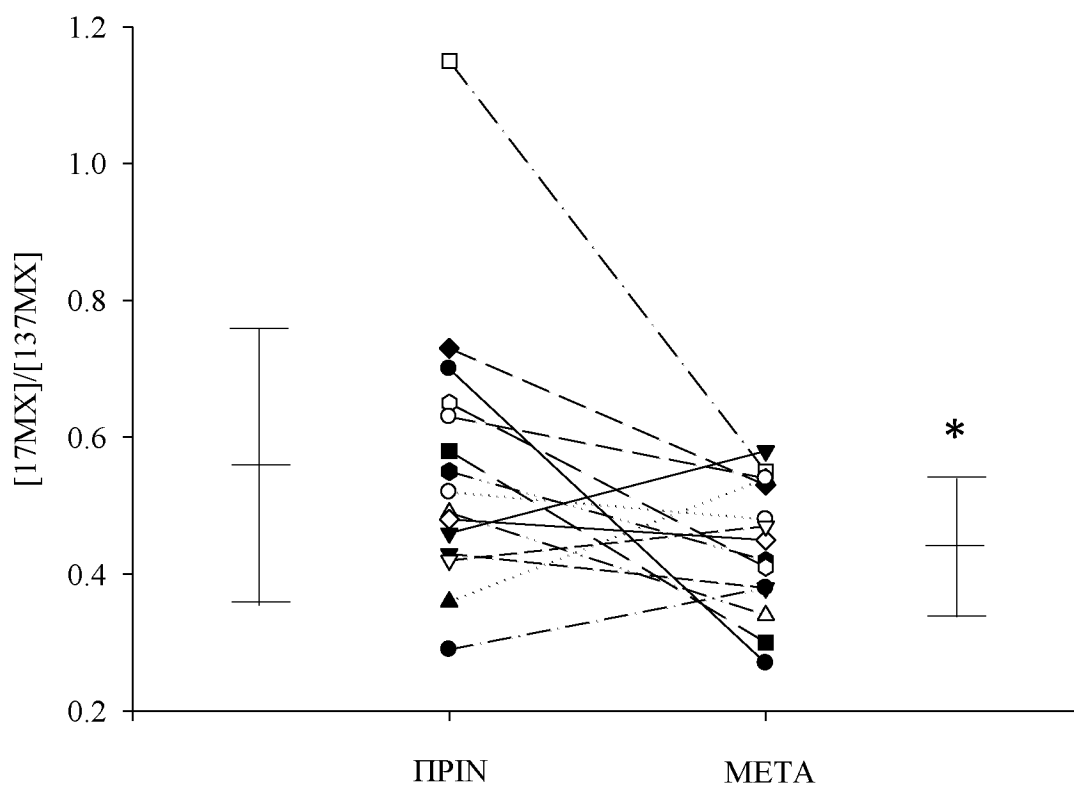
Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου (AFMU+1MU+1MX)/17MU στα ούρα ήταν μειωμένη στους εθελοντές κατά 6,2% μετά την περίοδο κατανάλωσης του *Sideritis scardica* χωρίς όμως η μείωση αυτή να φθάνει σε στατιστική σημαντικότητα ($3,87 \pm 0,65$ έναντι $3,63 \pm 0,70$, $p > 0,05$, t-test για σχετιζόμενα δείγματα; Σχήμα 8).

Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου 17U/(17U+17X) στο σίελο ήταν μειωμένη στους εθελοντές μετά την περίοδο κατανάλωσης του *Sideritis scardica* κατά 23,2%. Η μείωση αυτή παρουσίασε στατιστική σημαντικότητα ($0,56 \pm 0,20$ έναντι $0,43 \pm 0,13$, $p > 0,045$, t-test για σχετιζόμενα δείγματα; Σχήμα 9).

Η μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 δεν ήταν ομοιόμορφη για όλους τους εθελοντές. Όσον αφορά στα ούρα, 10 άτομα παρουσίασαν μείωση της τιμής του αντίστοιχου μεταβολικού λόγου ενώ 5 άτομα παρουσίασαν αύξηση. Η ποσοστιαία μείωση κυμάνθηκε από 4,0-34,7%. Όσον αφορά στον σίελο, 11 άτομα παρουσίασαν μείωση της τιμής του αντίστοιχου μεταβολικού λόγου και 4 άτομα αύξηση. Η ποσοστιαία μείωση κυμάνθηκε από 6,3-87%.



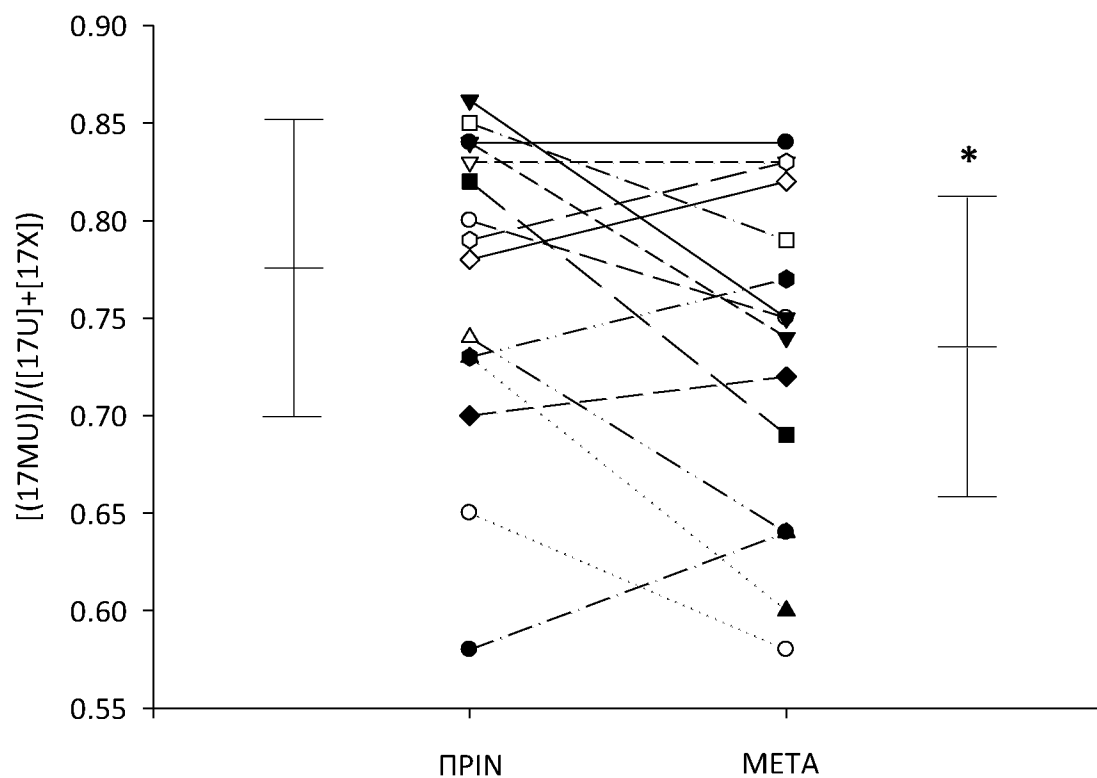
Σχήμα 8: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το CYP1A2 στα ούρα πριν και μετά τη χορήγηση του *Sideritis scardica*. Οι οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα.



Σχήμα 9: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το CYP1A2 στο σίελο πριν και μετά τη χορήγηση του *Sideritis scardica*. Οι οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα. * $p=0,044$, t-test για σχετιζόμενα δείγματα.

CYP2A6

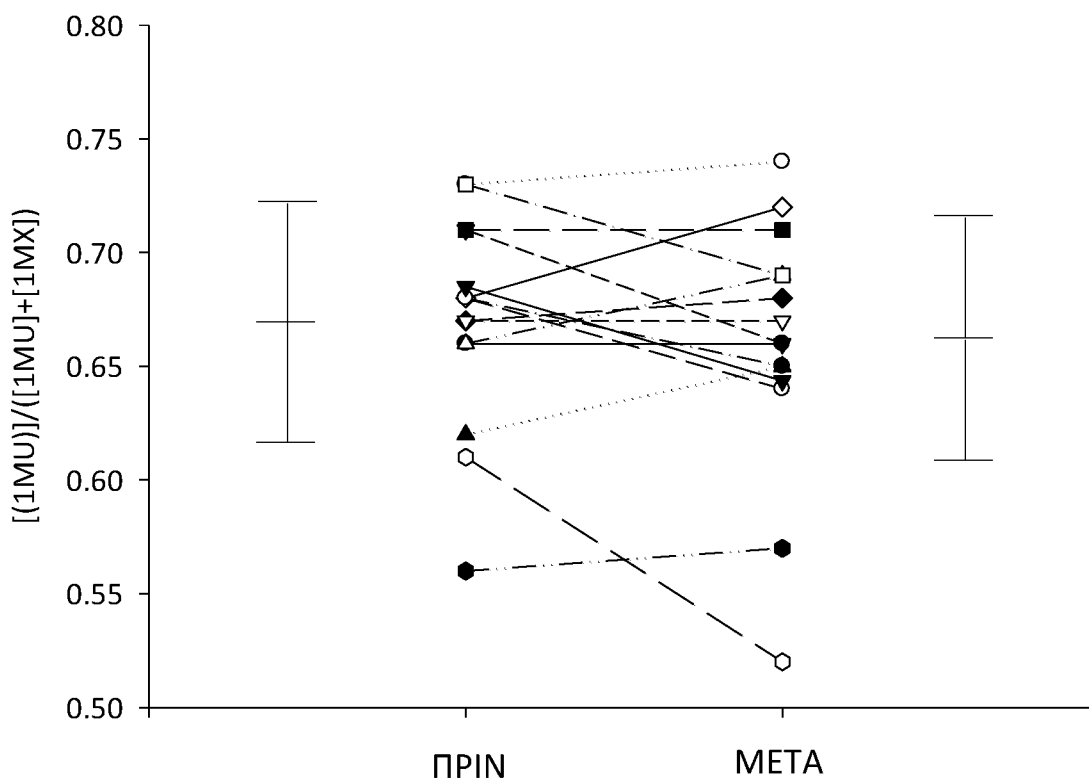
Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου 17MU/(17MU+17MX) στα ούρα ήταν μειωμένη στους εθελοντές μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψημάτος του *Sideritis scardica* κατά 5,2%. Η μείωση αυτή παρουσίασε οριακή στατιστική σημαντικότητα ($0,77 \pm 0,08$ έναντι $0,73 \pm 0,09$; $p=0,057$ t-test για σχετιζόμενα δείγματα; Σχήμα 10).



Σχήμα 10: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το CYP2A6 στα ούρα πριν και μετά τη χορήγηση του *Sideritis scardica*. Οι οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα. * $p=0,057$ για τα σχετιζόμενα δείγματα.

ΧΟ

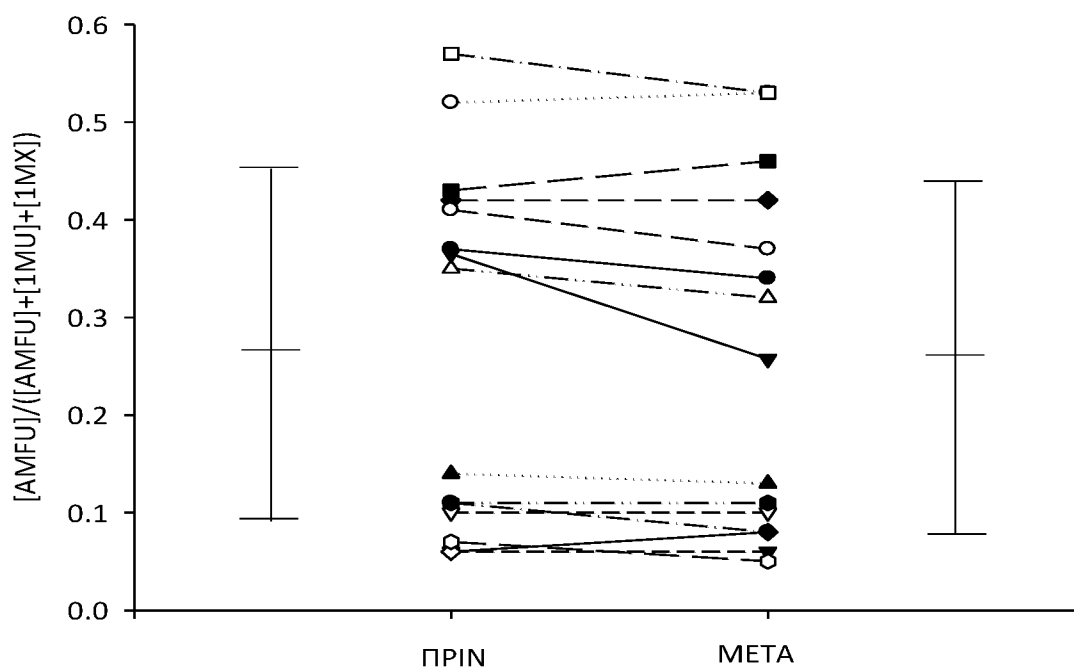
Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου $1MU/(1MU+1MX)$ στα ούρα παρέμεινε σταθερή στους εθελοντές πριν και μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψημάτος του *Sideritis scardica* ($0,67 \pm 0,05$ έναντι $0,66 \pm 0,06$; $p > 0,05$ t-test για τα σχετιζόμενα δείγματα; Σχήμα 11).



Σχήμα 11: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το ΧΟ στα ούρα πριν και μετά τη χορήγηση του *Sideritis scardica*. Οι οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα.

NAT2

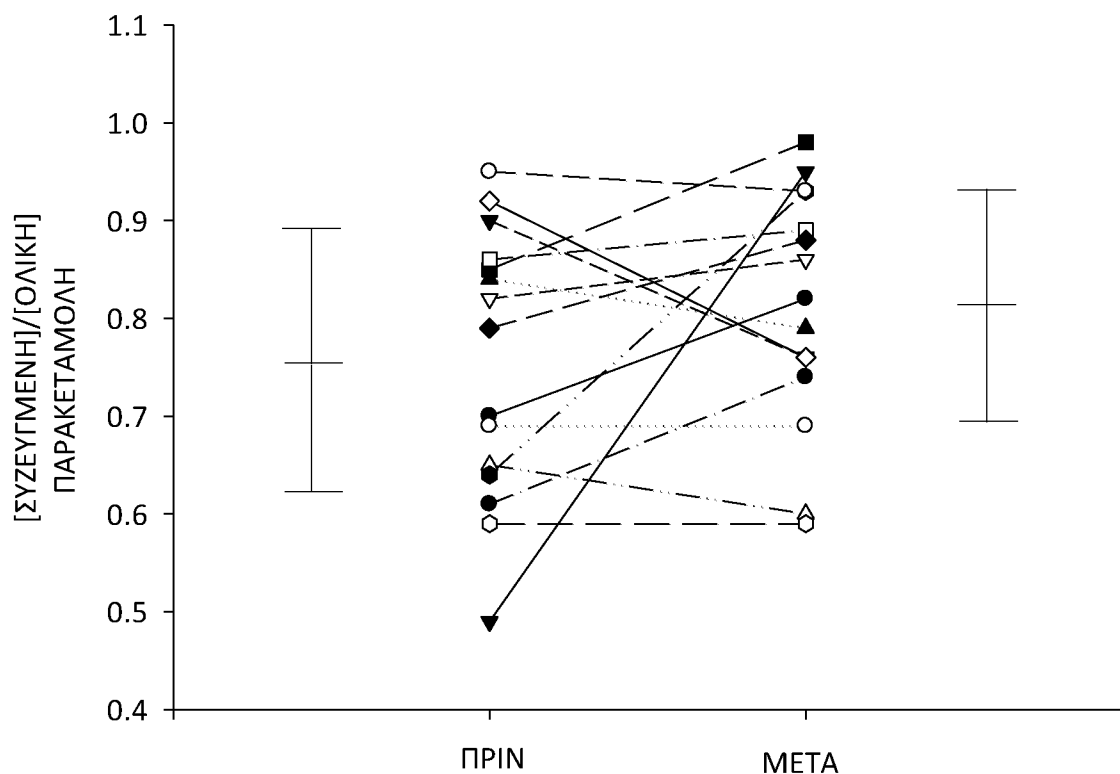
Η μέση τιμή του μεταβολικού λόγου $AFMU/(AFMU+1MU+1MX)$ στα ούρα παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη στους εθελοντές πριν και μετά την περίοδο κατανάλωσης του *Sideritis scardica* ($0,27 \pm 0,18$ έναντι $0,26 \pm 0,18$; $p > 0,05$ t-test για τα σχετιζόμενα δείγματα; Σχήμα 12). Προκειμένου να γίνει διαχωρισμός μεταξύ των βραδέων και ταχέων ακετυλιωτών, χρησιμοποιήθηκε η τιμή διαχωρισμού 0,25, η οποία έχει δειχθεί ότι διαχωρίζει τον Ελληνικό πληθυσμό σε βραδείς και ταχείς μεταβολιστές όσον αφορά το ένζυμο NAT2 [61]. Με βάση τη χρήση αυτής της τιμής διαχωρισμού 7 εθελοντές χαρακτηρίστηκαν ως βραδείς ακετυλιώτες ενώ 8 ως ταχείς. Ο φαινότυπος όλων των εθελοντών δεν μεταβλήθηκε μετά την κατανάλωση του *Sideritis scardica*. Στην συνέχεια έγινε διερεύνηση της επίδρασης της κατανάλωσης του *Sideritis scardica* με βάση το φαινότυπο της NAT2. Δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη μέση τιμή του μεταβολικού λόγου των βραδέων ακετυλιωτών μεταξύ των δύο φάσεων της δοκιμασίας ($0,093 \pm 0,030$ έναντι $0,087 \pm 0,028$; $p > 0,05$ t-test για τα σχετιζόμενα δείγματα). Παρομοίως, δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στη μέση τιμή του μεταβολικού λόγου των ταχέων ακετυλιωτών μεταξύ των δύο φάσεων της δοκιμασίας ($0,43 \pm 0,08$ έναντι $0,40 \pm 0,10$; $p >$



Σχήμα 12: Μεταβολικοί λόγοι της καφεΐνης για το NAT2 στα ούρα πριν και μετά τη χορήγηση του *Sideritis scardica*. Οι οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα.

UGT1A1/1A6

Η μέση τιμή του κλάσματος σύζευξης της παρακεταμόλης (σύζευγμένη/ολική) παρουσίασε αύξηση της τάξης του 8% μετά την περίοδο κατανάλωσης του αφεψημάτος του *Sideritis scardica* χωρίς στατιστική σημαντικότητα ($0,75 \pm 0,14$ έναντι $0,81 \pm 0,12$, $p > 0,05$ για σχετιζόμενα δείγματα; Σχήμα 13).



Σχήμα 13: Ποσοστά σύζευγμένης παρακεταμόλης πριν και μετά την χορήγηση του *Sideritis scardica*. Οι οριζόντιες και κατακόρυφες γραμμές υποδεικνύουν τις μέσες τιμές και την τυπική απόκλιση, αντίστοιχα.

4. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη κατά την οποία διερευνήθηκε η επίδραση του αφεψήματος του Σιδερίτη στην *in vivo* δραστικότητα των ενζύμων CYP1A2, CYP2A6, NAT2, XO και UGT1A1/1A6 σε ανθρώπους με φάρμακα-δείκτες την καφεΐνη και την παρακεταμόλη. Στην παρούσα εργασία οι συμμετέχοντες εθελοντές απείχαν, κατά την διάρκεια της μελέτης, από τρόφιμα και ποτά τα οποία είναι γνωστό ότι επιδρούν στη λειτουργικότητα των ενζύμων του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών καθώς επίσης και από κάθε είδους φάρμακο. Κατ' αυτόν τον τρόπο, περιορίστηκε, κατά το δυνατόν, η επίδραση των τυχαίων διατροφικών παραγόντων οι οποίοι θα μπορούσαν να συσκοτίσουν την επίδραση του αφεψήματος του Σιδερίτη στον οργανισμό. Η 3-ήμερη αποχή από διατροφικούς παράγοντες πριν από τη λήψη του φυσικού προϊόντος (wash-out period), απαντάται και σε άλλες παρόμοιες μελέτες [158].

Η διαδικασία της προετοιμασίας του αφεψήματος του Σιδερίτη περιελάμβανε τη θέρμανση του ξηρού προϊόντος (4gr) , το σύντομο βρασμό (2-3') και την εν συνεχεία παραμονή του σε θερμό νερό για 5' πριν από την τελική κατανάλωση του από τους εθελοντές. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται στην βιβλιογραφία ως decoction (αφέψημα) και προτιμήθηκε από την εμβάπτιση του ξηρού προϊόντος σε βραστό νερό η οποία περιγράφεται ως infusion (έγχυση). Πράγματι, σε εργασία κατά την οποία έγινε σύγκριση της ανάκτησης των φαινολικών οξέων και των φλαβονοειδών από υδατικά εκχυλίσματα φασκόμηλου (*Salvia officinalis* L.) αποδείχτηκε ότι η ποσοτική ανάκτηση των ουσιών αυτών ήταν σημαντικά υψηλότερη κατά τη διαδικασία του αφεψήματος σε σχέση με αυτήν της έγχυσης [159].

Παρ' όλο που στην παρούσα εργασία δεν έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φαινολικών ενώσεων που περιέχονταν στο αφέψημα του Σιδερίτη, υπάρχει μια μελέτη στην οποία έγινε ανάλυση της σύστασης του αφεψήματος του Σιδερίτη με HPLC σε συνδυασμό με ανίχνευση στο υπεριώδες και φασματοσκοπία μάζας (HPLC-DAD-ESI-MS/MS) και ανιχνεύτηκαν συνολικά 31 ενώσεις, παράγωγα του υδροξυκιναμικού οξέος, φαινυλαιθανοειδείς γλυκοσίδες και παράγωγα της λουτεολίνης, της υπολαετίνης της απιγενίνης και ισοσκουτελαρεΐνης. Οι πιο άφθονες ενώσεις στο αφέψημα ήταν οι φαινυλαιθανοειδείς γλυκοσίδες και η 7-O γλυκοσίδη της μεθυλοπολαετίνης. Το συνολικό περιεχόμενο σε φλαβονοειδή αντιπροσώπευε το 38%, κατά προσέγγιση, των συνολικών φαινολικών ενώσεων. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το φυτό αυτό είναι μια πλούσια πηγή 8-υδροξοφλαβονών της υπολαετίνης και της ισοσκουτελαρεΐνης [23].

Η δοσολογία, τέλος, του Σιδερίτη διαμορφώθηκε στα 4 gr εναερίων (υπεργείων) τμημάτων του φυτού ημερησίως τα οποία λαμβάνονταν σε δύο δόσεις, πρωί και βράδυ, υπό την μορφή 200 mL αφεψήματος. Η δοσολογία αυτή ήταν καλώς ανεκτή από τους εθελοντές και βρίσκεται εντός των συνήθως λαμβανομένων ποσοτήτων οι οποίες κυμαίνονται από 2,0-4,0 gr θρυμματισμένου φυτού σε 150-250 mL νερού, 3 φορές ημερησίως [160].

CYP1A2

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, παρατηρήθηκε μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2 μετά την περίοδο της κατανάλωσης του αφεψήματος του Σιδερίτη, όπως αυτή προσδιορίστηκε τόσο από τον μεταβολικό λόγο 17MX/137MX της καφεΐνης στον σίελο όσο και από τον αντίστοιχο λόγο (AFMU+1MU+1MX)/17MU στα ούρα. Η μέση μείωση του πρώτου λόγου ήταν 23,2% και παρουσίασε στατιστική σημαντικότητα ενώ του δεύτερου ήταν 6,2% χωρίς στατιστική σημαντικότητα. Είναι πιθανόν ο μεταβολικός λόγος 17MX/137MX στον σίελο να έχει μεγαλύτερη ευαισθησία στην απεικόνιση της δραστηριότητας του CYP1A2 από τον αντίστοιχο μεταβολικό λόγο στα ούρα καθώς η μετατροπή της 137MX προς 17MX καταλύεται ειδικά από το CYP1A2, ενώ οι μεταβολίτες που συμπεριλαμβάνονται στον λόγο (AFMU+1MU+1MX)/17MU παράγονται από την παράλληλη δράση και άλλων ενζύμων, πλην του CYP1A2 [153].

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ημερήσια κατανάλωση αφεψήματος Σιδερίτη επιδρά σημαντικά στη δραστηριότητα του CYP1A2. Η μείωση της δραστηριότητας του CYP1A2, η οποία επιτυγχάνεται από την κατανάλωση 4gr Σιδερίτη την ημέρα υπό την μορφή αφεψήματος, είναι πιθανόν να επηρεάζει, σε σημαντικό βαθμό, την φαρμακοκινητική συγχορηγούμενων φαρμάκων τα οποία μεταβολίζονται από το CYP1A2. Επιπλέον, η μείωση αυτή είναι πιθανό να προσφέρει χημειοπροστασία, σε υπολογίσιμο βαθμό, έναντι προκαρκινογόνων τα οποία ενεργοποιούνται μεταβολικά από το CYP1A2.

Όπως έχει αναφερθεί ανωτέρω, τα κυριότερα συστατικά του αφεψήματος του Σιδερίτη είναι οι φαινυλαιθανοειδείς γλυκοσίδες και η γλυκοσίδη της μεθυλπολαετίνης. Σε μικρότερες αναλογίες περιέχονται επίσης γλυκοσίδες των φλαβονοειδών της λουτεολίνης, της υπολαετίνης της απιγενίνης και ισοσκουτελαρεΐνης. Εξ όσων είναι δυνατόν να γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν μελέτες οι οποίες να έχουν διερευνήσει την επίδραση των φαινυλαιθανοειδών στη δραστηριότητα των ενζύμων του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών σε ανθρώπους. Υπάρχει μόνο μια σχετική μελέτη η οποία διερεύνησε την επίδραση της φαινυλαιθανολοειδούς ακτεοσίδης, ή αλλιώς

βερμπασκοσίδης, σε ποντικούς κατά την οποία δείχτηκε ότι η ουσία αυτήν είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της δραστηριότητας και του επιπέδου της πρωτεΐνης του CYP2E1 [161].

Τα υπόλοιπα συστατικά που απαντώνται στο αφέψημα του Σιδερίτη ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονοειδών και την υποκατηγορία των φλαβονών. Η σχέση της δομής των φλαβονοειδών και της επίδρασής τους στα ένζυμα του συστήματος P450 έχει διερευνηθεί σε *in vitro* μελέτη με την χρήση ηπατικών μικροσωμάτων ανθρώπου. Σ' αυτή δείχτηκε ότι φλαβονοειδή με ελεύθερες υδροξυλομάδες, αναστέλλουν τις αντιδράσεις οι οποίες διεξάγονται μέσω του συστήματος P450, ενώ φλαβονοειδή χωρίς υδροξυλομάδες διεγείρουν την δραστηριότητα του P450 [162]. Φαίνεται, επίσης, ότι επίπεδα μόρια με χαμηλό λόγο όγκου/επιφανείας παρουσιάζουν υψηλή ανασταλτική δράση έναντι του CYP1A2. Για τον λόγο αυτό οι φλαβανόνες και οι φλαβάνες, χωρίς τον διπλό δεσμό C2-C3, έχοντας τον B δακτύλιο σχεδόν κάθετο στο υπόλοιπο μόριο, παρουσιάζουν μειωμένη ανασταλτική αποτελεσματικότητα έναντι άλλων φλαβονοειδών. Η παρουσία πολλαπλών υδροξυλομάδων στον δακτύλιο B, επίσης, έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της ανασταλτικής ικανότητας [163], ενώ η παρουσία υδροξυλομάδων στις θέσεις C5, C7 και C4' έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ανασταλτικής ικανότητας. Φαίνεται, γενικώς, ότι κρίσιμος παράγοντας για την ανασταλτική ικανότητα είναι οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του CYP1A2 και των φλαβονοειδών [164,165,22]. Πράγματι, σε *in vitro* μελέτες έχει βρεθεί ότι οι φλαβόνες απιγενίνη και η λουτεολίνη ανέστειλαν τη δραστηριότητα του ανθρώπινου CYP1A2 [166,33]. Όσον αφορά την υπολαετίνη, σχετικές μελέτες δεν βρέθηκαν στην βιβλιογραφία αλλά καθώς η ένωση αυτή ανήκει στην υποκατηγορία των φλαβονών αναμένεται ότι η δράση της θα έχει ανασταλτικό αποτέλεσμα στην δραστηριότητα του CYP1A2. Η ισοσκουτελαρεΐνη, τέλος, ανήκει και αυτή στην κατηγορία των φλαβονών και συνεπώς αναμένεται να παρουσιάζει ανασταλτική επίδραση στη δραστηριότητα του CYP1A2. Πράγματι, η ένωση σκουτελαρίνη, η οποία είναι ισομερής με την γλυκοσίδα της ισοσκουτελαρεΐνης, δείχτηκε ότι είναι ασθενής αναστολέας της δραστηριότητας του CYP1A2 σε αρουραίους [167]. Από τα παραπάνω βγαίνει το συμπέρασμα ότι όλα τα κύρια συστατικά του αφεψήματος του Σιδερίτη, μεμονωμένα, ασκούν ανασταλτική επίδραση στη δραστηριότητα του CYP1A2. Κατά συνέπεια, η παρατηρηθείσα στην παρούσα μελέτη μείωση της *in vivo* δραστηριότητας του CYP1A2, είναι πιθανόν να οφείλεται στην δράση των συστατικών αυτών ακόμη και στη περίπτωση που αυτά ενδέχεται να έχουν χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Πράγματι, έχει παρατηρηθεί ότι ακόμη και χαμηλές δόσεις των συστατικών που περιλαμβάνονται στις τροφές μπορεί να έχουν συνδυασμένη προσθετική ή/και συνεργιστική δράση, παρόλο που δεν έχουν αποτελέσματα όταν χορηγούνται ξεχωριστά. [168,169]. Όσον αφορά τον μηχανισμό της αναστολής του ενζύμου, σε σχετική μελέτη έχει διαπιστωθεί ότι οι

φλαβόνες, μεταξύ των οποίων η απιγενίνη και η σκουτελαρίνη, ασκούν ανταγωνιστική αναστολή του CYP2C19 μέσω αλληλεπίδρασης με την θέση πρόσδεσης του υποστρώματος [170].

CYP2A6

Μία πολύ ειδική αντίδραση η οποία καταλύεται από το CYP2A6 είναι η 7- υδροξυλίωση της κουμαρίνης (1,2-βενζοπυρόνη) η οποία είναι μία φυσική ουσία που απαντάται σε πολλά φυτά. Μετά από κατανάλωση κουμαρίνης, ποσοστό μεγαλύτερο του 95% της 7-OH-κουμαρίνης που σχηματίζεται απεκκρίνεται, μέσα σε 4 ώρες, στα ούρα συνδεδεμένη με γλυκουρονικό. Συνεπώς, η κουμαρίνη είναι το κατ' εξοχήν υπόστρωμα για την εκτίμηση της μεταβολικής ικανότητας του CYP2A6 *in vivo* [90].

Εκτός από την 7-υδροξυλίωση της κουμαρίνης, μία άλλη αντίδραση η οποία καταλύεται, κυρίως, από το CYP2A6 είναι η 8-υδροξυλίωση της 17MX προς 17MU με μικρότερη συμμετοχή του CYP1A2. Σε μικρές συγκεντρώσεις 17MX (0,1 mM), όμως, το CYP2A6 είναι το μοναδικό ένζυμο που καταλύει την παραπάνω αντίδραση [98]. Επομένως, η καφεΐνη, παρόλο που παρουσιάζει μικρότερη ειδικότητα, μπορεί να αποτελέσει ένα εναλλακτικό υπόστρωμα για την εκτίμηση της δραστηριότητας του CYP2A6 *in vivo*. Με βάση, λοιπόν, την οξείδωση της 17MX έχει προταθεί ο μεταβολικός λόγος 17MU/17MX ως δείκτης της δραστηριότητας του CYP2A6 καθώς ανταποκρίνεται στον θεωρητικό λόγο «μεταβολίτης(-ες)/φάρμακο» [171,98].

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ο λόγος 17MU/(17MU+17MX) ο οποίος αποτελεί τροποποίηση του λόγου 17MU/17MX και εκφράζει τη συγκέντρωση του 17MU ως ποσοστό της συνολικής οδού της οξείδωσης της 17MX [134]. Πράγματι, ο λόγος αυτός εμφάνισε μικρότερη μεταβλητότητα σε βάθος χρόνου, σε ένα δείγμα υγιών εθελοντών, και προτιμήθηκε έναντι του αρχικού (μη δημοσιευθέντα δεδομένα).

Στην παρούσα εργασία, οι μέσες τιμές του λόγου αυτού παρουσίασαν μείωση της τάξης του 5,2%, μετά την κατανάλωση του αφεψημάτος του Σιδερίτη, η οποία παρουσίασε οριακή στατιστική σημαντικότητα $p=0.057$. Άλλες *in vivo* και *in vitro* μελέτες κατά τις οποίες διερευνήθηκε η επίδραση διαφόρων άλλων φλαβονοειδών στη δραστηριότητα του CYP2A6 έχουν δώσει αντιφατικά αποτελέσματα. Αναστολή του CYP2A6 έχει παρατηρηθεί σε *in vivo* και *in vitro* μελέτες από φλαβονοειδή όπως η απιγκενίνη, η λουτεολίνη και η κουερσετίνη, από διάφορες ισοφλαβόνες [172,173] και φλαβονόλες [174], ενώ επαγωγή του CYP2A6 έχει παρατηρηθεί σε *in vivo* μελέτες από την ισοφλαβόνη γκενιστεΐνη και την φλαβονόλη κουερσετίνη με φάρμακο-δείκτη την καφεΐνη [135,138]. Με βάση ότι η απιγενίνη και η

λουτεολίνη είναι συστατικά του αφεινήματος του Σιδερίτη είναι πιθανόν η μείωση της δραστηριότητας του CYP2A6 που παρατηρήθηκε στους εθελοντές να οφείλεται στη δράση αυτών των συστατικών. Στο ίδιο πλαίσιο μπορεί να υπαχθεί και η δράση της υπολαετίνης και της ισοσκουτελαρεΐνης οι οποίες ανήκουν στην κατηγορία των φλαβονών όπως και οι δύο προαναφερθείσες.

XO

Η XO είναι πηγή ελευθέρων ριζών και η λειτουργικότητά της αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας και επαναιμάτωσης των ιστών (ischemia-reperfusion injury), σε ασθένειες όπως η αρθρίτιδα, η ρευματοειδής αρθρίτιδα, το άσθμα και τα καρδιαγγειακά νοσήματα οι οποίες παρουσιάζονται πιο συχνά σε ηλικιωμένους [175,176]. Η δραστηριότητα της XO αναστέλλεται από την αλλοπουρινόλη [148] και επάγεται από την ιντερφερόνη- γ [177], τον παράγοντα TNF- α , την ιντερλευκίνη-1 β [100], ενώ δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την κατανάλωση αλκοόλ [101].

Όσον αφορά την επίδραση των διαφόρων φυσικών προϊόντων στη λειτουργικότητα της XO, σε προγενέστερη *in vitro* μελέτηδείχθηκε ότι τα φλαβονοειδή λουτεολίνη, εριοδικτυόλη και το καφεϊκό οξύ ήταν ισχυροί αναστολείς της XO [178]. Σε πιο πρόσφατη *in vitro* μελέτη βρέθηκε ότι το αιθανολικό εκχύλισμα του φυτού *Gnaphalium affine* είχε ανασταλτικό αποτέλεσμα στην δραστηριότητα της XO. Μεταξύ των συστατικών του εκχυλίσματος ανιχνεύτηκε η παρουσία της απιγενίνης και της λουτεολίνης, οι οποίες, σύμφωνα με τους συγγραφείς συνέβαλαν στην ανασταλτική δράση [179]. Σε παρόμοια *in vitro* μελέτη διερευνήθηκε η επίδραση του μεθανολικού εκχυλίσματος του φυτού *Centaurea virgata* Lam. στη λειτουργικότητα της XO. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα ανέστειλε τη λειτουργικότητα της XO και το γεγονός αυτό αποδόθηκε στις φλαβόνες απιγενίνη και ισπιδουλίνη (hispidulin) οι οποίες ανιχνεύτηκαν μεταξύ των συστατικών του εκχυλίσματος [180].

Στην παρούσα εργασία η μέση τιμή του δείκτη της δραστηριότητας της XO παρέμεινε σχεδόν αμετάβλητη μεταξύ των περιόδων πριν και μετά την κατανάλωση του Σιδερίτη. Είναι πιθανόν, οι *in vivo* συγκεντρώσεις των φλαβονοειδών που επιτυγχάνονται μέσω της κατανάλωσης του Σιδερίτη να μην αντανakλούν τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται στα *in vitro* πειράματα. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την ποικιλιότητα της δραστηριότητας της XO μεταξύ των ατόμων, να μην επέτρεψε την *in vivo* εμφάνιση ανασταλτικής επίδρασης του αφεινήματος στην XO.

Με βάση τα ανωτέρω φαίνεται ότι η τακτική κατανάλωση του αφεψήματος του Σιδερίτη δεν φαίνεται να συνεισφέρει στην άμυνα έναντι του οξειδωτικού στρες που οφείλεται σε ρευματικά και φλεγμονώδη νοσήματα.

NAT2

Σε *in vitro* μελέτη με τη χρήση κυταροπλάσματος από ανθρώπινα ηπατοκύτταρα διερευνήθηκε η επίδραση διαφόρων φλαβονοειδών στην ενζυμική δραστηριότητα της NAT2 καιδείχθηκε ότι αυτά ασκούν ανασταλτική δραστηριότητα σε συνάρτηση με τη χημική τους δομή. Συγκεκριμένα, η ανασταλτική δραστηριότητα των φλαβονοειδών ήταν ανάλογη του αριθμού των υδροξυλίων στο δακτύλιο B. Η αναστολή αυτή συντελέστηκε μέσω του μηχανισμού της μη συναγωνιστικής αναστολής, δηλαδή της αναστολής εκείνης κατά την οποία οι αναστολείς προσδένονται σε σημείο διαφορετικό από την καταλυτική τριάδα αμινοξέων Cys-His-Asp του ενεργού κέντρου του ενζύμου. Το μέγιστο ανασταλτικό αποτέλεσμα παρουσίασαν οι φλαβονόλες κουαρσετίνη και κεμφερόλη, η φλαβανόλη ταξιφολίνη και η ισοφλαβόνη γενιστεΐνη. Αντίθετα, η φλαβόνη χρυσίνη δεν είχε σημαντική επίδραση στην δραστηριότητα της NAT2 [181]. Δεδομένου ότι, το αφέψημα του Σιδερίτη περιέχει, κυρίως, φλαβόνες, δεν αναμένεται η κατανάλωσή του να έχει κάποια σημαντική επίδραση στην *in vivo* δραστηριότητα της NAT2, υπόθεση που βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Επιδημιολογικά, ο φαινότυπος και ο γονότυπος του βραδέος ακετυλιωτή έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση καρκίνου της ουροδόχου κύστης, ιδίως σε άτομα με υψηλή έκθεση σε αρωματικές αμίνες και σε καπνιστές [116,182,84]. Φαίνεται ότι οι βραδείς ακετυλιωτές είναι λιγότερο αποτελεσματικοί στην αποτοξίνωση από τις αρωματικές αμίνες και άλλα περιβαλλοντικά καρκινογόνα με αποτέλεσμα τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Με βάση τα ανωτέρω, φαίνεται ότι η τακτική κατανάλωση του αφεψήματος του Σιδερίτη δεν φαίνεται να συμβάλει στη χημειοπροστασία έναντι του καρκίνου, όσον αφορά τους βραδείς ακετυλιωτές.

UGT1A1/1A6

Στην παρούσα μελέτη η εκτίμηση της δραστηριότητας των UGT1A1/1A6 έγινε μέσω του προσδιορισμού του ποσοστού της συζευγμένης παρακεταμόλης σε σχέση με την ολική. Η μέτρηση της ολικής, και κατ' επέκταση της συζευγμένης παρακεταμόλης, έγινε με τη βοήθεια του ενζύμου β-γλυκουρονιδάση το οποίο ήταν ανασυνδυσμένο από υπερέκφραση σε στέλεχος *Escherichia coli* BL21 και δεν παρουσιάζει καθόλου δραστηριότητα σουλφατάσης. Η χρήση του

συγκεκριμένου ενζύμου κρίθηκε απαραίτητη καθώς, στα ούρα, η παρακεταμόλη είναι συζευγμένη με γλυκουρονικό και θειικό και έτσι η χρησιμοποίηση β-γλυκουρονιδάσης από *Helix pomatia*, η οποία παρουσιάζει και δευτερεύουσα δράση σουλφατάσης, δεν θα έδινε ξεκάθαρη εικόνα για την ποσότητα της γλυκουρονιδωμένης παρακεταμόλης και κατά συνέπεια της δράσης των UGT1A1/1A6. Με βάση τη χρησιμοποίηση του ενζύμου αυτού, στην παρούσα εργασία, δείχθηκε ότι δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα ποσοστά της συζευγμένης παρακεταμόλης πριν και μετά τη χορήγηση του Σιδερίτη. Επομένως, φαίνεται ότι δεν επηρεάστηκε η δραστηριότητα των ενζύμων UGT1A1/1A6.

Σε *in vitro* μελέτη με ανθρώπινα κύτταρα ηπατώματος HepG2 δείχθηκε ότι οι φλαβόνες λουτεολίνη και απιγενίνη είχαν επαγωγική δράση στο ένζυμο UGT1A1. Η δράση αυτή σχετίστηκε με την παρουσία 2 υδροξυλομάδων στον Α-δακτύλιο του μορίου, ενώ η παρουσία υδροξυλομάδας στην 3-θέση του δακτυλίου C καθώς και ο κορεσμός του δεσμού 2,3 ανέστειλε την επαγωγική δράση [183].

Σε άλλη *in vitro* μελέτη με τη χρήση ανθρώπινων ανασυνδυασμένων UGTs δείχτηκε ότι η σκουτελαρεΐνη, η οποία έχει παρόμοια δομή με το συστατικό του αφεψήματος του Σιδερίτη ισοσκουτελαρεΐνη, είχε σημαντικό ανασταλτικό αποτέλεσμα στη δραστηριότητα των UGT1A1 και UGT1A6 [184].

Από τα ανωτέρω, συνάγεται ότι κάποια από τα κύρια συστατικά του αφεψήματος του Σιδερίτη έχουν αλληλοσυγκρουόμενη επίδραση στη δραστηριότητα των UGT1A1/1A6 και έτσι δεν φαίνεται πιθανό η κατανάλωση του αφεψήματος να επιφέρει κάποια σημαντική τροποποίηση στην *in vivo* λειτουργικότητα των ενζύμων αυτών, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

5. Συμπέρασμα

Κατά την παρούσα εργασία μελετήθηκε η δράση του αφεψημάτος του Sideritis Scardica στην *in vivo* δραστικότητα των ανθρώπινων ενζύμων του μεταβολισμού των ξενοβιοτικών CYP1A2, CYP2A6, XO, NAT2 και UGT1A1/1A6. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δραστικότητα του CYP1A2 παρουσίασε σημαντική μείωση, μετά την ημερήσια κατανάλωση αφεψημάτος 4gr ξηρού προϊόντος Sideritis Scardica. Σημαντική, αλλά μικρότερου βαθμού ήταν και η μείωση της δραστικότητας του CYP2A6 ενώ δεν επηρεάστηκε, σε σημαντικό βαθμό, η δραστικότητα των XO, NAT2 και UGT1A1/1A6. Είναι πιθανόν η επίδραση του Sideritis Scardica στη λειτουργικότητα του CYP1A2 να επηρεάζει την αποβολή των φαρμάκων τα οποία είναι υποστρώματα του CYP1A2 και κατά συνέπεια η χρήση του να απαιτεί την τροποποίηση των θεραπευτικών δοσολογιών των φαρμάκων αυτών. Επιπλέον, η αναστολή της δραστικότητας των CYP1A2 και CYP2A6 είναι δυνατόν να συμβάλει στη χημειοπροστασία έναντι της καρκινογένεσης μέσω της μειωμένης μεταβολικής ενεργοποίησης των προκαρκινογόνων του περιβάλλοντος και της τροφής.

Περισσότερες μελέτες θα πρέπει να διεξαχθούν για την εκτίμηση της ενδεχόμενης ωφέλειας από την κατανάλωση του αφεψημάτος του Sideritis scardica στους ανθρώπους.

6. Βιβλιογραφία

- 1] McKay DL, and Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). *Phytotherapy Research*, 2006. 20(8): 619-633.
- 2] Kostadinova E, Nikolova D, Alipieva K, Stefova M, Stefkov G, Evstatieva L, Matevski V, Bankova V. Chemical constituents of the essential oils of *Sideritis scardica* Griseb. and *Sideritis raeseri* Boiss and Heldr. from Bulgaria and Macedonia. *Natural product research*, 2007, 21: 819-23.
- 3] Gabrieli CN, Kefalas PG, Kokkalou EL. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis raeseri*. *Journal of ethnopharmacology*, 2005, 96: 423-8.
- 4] Villar A, Gasco MA, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory and anti-ulcer properties of hypolaetin-8-glucoside, a novel plant flavonoid. *The journal of pharmacy and pharmacology* 1984, 36(12): 820-3.
- 5] Rios JL, Mañez S, Paya M, Alcaraz MJ. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalambrensis*. *Phytochemistry*, 1992, 31(6):1947-50.
- 6] de las Heras B, Vivas JM, Villar A. Anti-inflammatory activity of *Sideritis javalambrensis* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 1994, 41(1-2):15-7.
- 7] <http://www.tzoumerka-park.gr>
- 8] Petreska J, Stefkov G, Kulevanova S, Alipieva K, Bankova V, Stefova M. Phenolic compounds of mountain tea from the Balkans: LC/DAD/ESI/MSn profile and content. *Natural product communications*, 2011, 6: 21-30.
- 9] Tadić VM, Jeremic I, Dobric S, Isakovic A, Markovic I, Trajkovic V, Bojovic D, Arsic I. Anti-inflammatory, gastroprotective, and cytotoxic effects of *Sideritis scardica* extracts. *Planta Medica*, 2012, 78(5):415-27.
- 10] Danesi F, Saha S, Kroon PA, Glibetić M, Konić-Ristić A, D'Antuon LF, Bordoni A. Bioactive-rich *Sideritis scardica* tea (mountain tea) is as potent as *Camellia sinensis* tea at inducing cellular antioxidant defences and preventing oxidative stress. *Journal of the science of food and agriculture*, 2013, 93: 3558-64.
- 11] Fraga BM. Phytochemistry and chemotaxonomy of *Sideritis* species from the Mediterranean region. *Phytochemistry*, 2012, 76:7-24.
- 12] Domínguez-Avila JA, Wall-Medrano A, Velderrain-Rodríguez GR, Chen CO,

Salazar-López NJ, Robles-Sánchez M, González-Aguilar GA. Gastrointestinal interactions, absorption, splanchnic metabolism and pharmacokinetics of orally ingested phenolic compounds. *Food and Function*, 2017, 8(1):15-38.

13] Alam MA, Subhan N, Hossain H, Hossain M, Reza HM, Rahman MM, Ullah MO. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition and metabolism*, 2016, 11;13: 27

14].Yang WS, Jeong D, Yi YS, Park JG, Seo H, Moh SH, Hong S, Cho JY. IRAK1/4-targeted anti-inflammatory action of caffeic acid. *Mediators of inflammation*, 2013, :518183.

15]Pei K, Ou J, Huang J, Ou S. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities *Journal of the science of food and agriculture*, 2016, 96(9): 2952-62.

16] Taofiq O, González-Paramás AM, Barreiro MF, Ferreira IC. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review.*molecules*,2017, ;22(2): doi: 10.3390.

17] Sheng GQ, Zhang JR, Pu XP, Ma J, Li CL. Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. *European journal of pharmacology*, 2002, 451(2): 119-24.

18] Ito N, Nihei T, Kakuda R, Yaoita Y, Kikuchi M. Five new phenylethanoid glycosides from the whole plants of *Lamium purpureum* L. *Chemical and pharmaceutical bulletin (Tokyo)*, 2006, 54(12): 1705-8.

19]Rigano D, Formisano C, Basile A, Lavitola A, Senatore F, Rosselli S, Bruno M. Antibacterial activity of flavonoids and phenylpropanoids from *Marrubium globosum* ssp. *libanoticum*. *Phytotherapy research*, 2007, 21(4): 395-7.

20] Vrchovska V, Spilkova J, Valentao P, Sousa C, Andrade PB, Seabra RM. Assessing the antioxidative properties and chemical composition of *Linaria vulgaris* infusion. *Natural product research*, 2008, 22(9): 735-46.

21] Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology In Vitro*, 2006, 20(2):187-210.

22] Hodek P, Trefil P, Stiborová MFlavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-Biological Interactions*, 2002, 139(1):1-21.

23] Petreska Stanoeva J, Stefova M. Assay of urinary excretion of polyphenols after ingestion of a cup of mountain tea (*Sideritis scardica*) measured by HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2013, 6: 10488-97.

- 24] Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural product reports*, 2009, 28: 1001-43.
- 25] Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Research International*, 2015,:905215.
- 26] Day AJ, DuPont MS, Ridley S, Rhodes M, Rhodes MJ, Morgan MR, Williamson G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS letters*, 1998, 25: 71-5.
- 27] Selma MV, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2009, 57: 6485-501.
- 28] Monagas M, Urpi-Sarda M, Sánchez-Patán F, Llorach R, Garrido I, Gómez-Cordovés C, Andres-Lacueva C, Bartolomé B. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food and function*, 2010, 1:233-53.
- 29] D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International journal of molecular sciences*, 2010. 11:1321-42.
- 30] Spencer JP, Abd-el-Mohsen MM, Rice-Evans C. Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: implications for their bioactivity. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2004, 423:148-61.
- 31] Kanq ZC, Tsai SJ, Lee H. Quercetin inhibits benzo[a]pyrene-induced DNA adducts in human Hep G2 cells by altering cytochrome P-450 1A1 gene expression. *Nutrition and Cancer*, 1999, 35(2):175-179.
- 32] Edenharter R, von Petersdorff I, Rauscher R. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutation Research*, 1993,287(2):261-274.
- 33] Kim HJ, Lee SB, Park SK, Kim HM, Park YI, Dong MS. Effects of hydroxyl group numbers on the B-ring of 5,7-dihydroxyflavones on the differential inhibition of human CYP 1A and CYP1B1 enzymes. *Archives of Pharmacal Research*, 2005, 28(10): 1114-1121.
- 34] Roberts DW, Doerge DR, Churchwell MI, Gamboa da Costa G, Marques MM, Tolleson WH. Inhibition of extrahepatic human cytochromes P450 1A1 and 1B1 by metabolism of isoflavones found in *Trifolium pratense* (red clover). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004,52(21):6623-6632.

- 35] Zuber R, Modrianský M, Dvorák Z, Rohovský P, Ulrichová J, Simánek V, Anzenbacher P. Effect of silybin and its congeners on human liver microsomal cytochrome P450 activities. *Phytotherapy Research*, 2002 16(7): 632-638.
- 36] Foster BC, Vandenhoek S, Hana J, Krantis A, Akhtar MH, Bryan M, Budzinski JW, Ramputh A, Arnason JT. In vitro inhibition of human cytochrome P450-mediated metabolism of marker substrates by natural products. *Phytomedicine*, 2003, 10(4): 334-342.
- 37] Le Bail JC, Laroche T, Marre-Fournier F, Habrioux G. Aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. *Cancer Letters*, 1998, 133(1): 101-106.
- 38] Williams JA, Ring BJ, Cantrell VE, Campanale K, Jones DR, Hall SD, Wrighton SA. Differential modulation of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)-catalyzed estradiol-3-glucuronidation by the addition of UGT1A1 substrates and other compounds to human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 2002, 30(11): 1266-1273.
- 39] Kohno H, Tanaka T, Kawabata K, Hirose Y, Sugie S, Tsuda H, Mori H. Silymarin, a naturally occurring polyphenolic antioxidant flavonoid, inhibits azoxymethane-induced colon carcinogenesis in male F344 rats. *International Journal of Cancer*, 2002,101(5):461-468.
- 40] Harris RM, Wood DM, Bottomley L, Blagg S, Owen K, Hughes PJ, Waring RH, Kirk CJ. Phytoestrogens are potent inhibitors of estrogen sulfation: implications for breast cancer risk and treatment. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 2004, 89(4):1779-1787.
- 41] Miranda CL, Aponso GL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR. Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells. *Cancer Letters*, 2000, 149(1-2):21-29.
- 42] Chen C. and Kong AN. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radical Biology & Medicine*, 2004, 36(12): 1505-1516.
- 43] Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, Wolf CR. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. *Xenobiotica*, 1998, 28:1129-1165.
- 44] Parke DV. and Ioannides C. Role of mixed-function oxidases in the formation of biological reactive intermediates. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1981, 136: 23-38.
- 45] Olson J. Κλινική Φαρμακολογία Διασκεδαστικά Απλή, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997: 7.

- 46] Sim SC. and Ingelman-Sundberg M. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. *Human Genomics*, 2010, 4(4):278-281.
- 47] Landi MT, Sinha R, Lang NP, Kadlubar FF. Human cytochrome P4501A2. In Ryder W (ed) Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. *IARC Scientific Publications no 148*. International Agency for Research in Cancer, Lyon, 1999 :173-195.
- 48] Pelkonen O, Turpeinen M, Hakkola J, Honkakoski P, Hukkanen J, Raunio H. Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status. *Archives of Toxicology*, 2008, 82(10):667-715.
- 49] Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, GuengerichFP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal Pharmacology Experimentals and Therapeutics*, 1994, 270:414-423.
- 50] Sinha R, Rothman N, Brown ED, Mark SD, Hoover RN, Caporaso NE. Pan-Fried Meat Containing High Levels of Heterocyclic Aromatic Amines but Low Levels of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Induces Cytochrome P4501A2 Activity in Humans. *Cancer Research*, 1994, 54:6154-6159.
- 51] Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL. Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. *Cancer Res* 1994, 54:101-108.
- 52] Kot M. and Daniel WA. The relative contribution of human cytochrome P450 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: an in vitro comparative study with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. *Biochemical Pharmacology*, 2008, 76(4):543-551.
- 53] Faber MS, Jetter A, Fuhr U. Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2005, 97(3):125-134.
- 54] Yamazaki H, Shaw PM, Guengerich FP, Shimada T. Roles of cytochromes P450 1A2 and 3A4 in the oxidation of estradiol and estrone in human liver microsomes. *Chemical Research in Toxicology*, 1998,11:659-665.
- 55] Butler MA, Lang NP, Young JF, Caporaso NE, Vineis P, Hayes RB, et al. Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites. *Pharmacogenetics* 1992, 2:116-127.
- 56] Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jansen M. Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative

- exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer of polyps. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 1994, 3:675-682.
- 57] Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Shin S, Kadlubar FF, Kamataki T. Phenotyping of CYP1A2 in Japanese population by analysis of caffeine urinary metabolites: absence of mutation prescribing the phenotype in the CYP1A2 gene. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 1994, 3:413-421.
- 58] Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, Roots I. Functional significance of C—A polymorphism in intron-1 of the cytochrome CYP1A2 gene tested with caffeine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1999, 47:445-449.
- 59] Okey AB, Franc MA, Moffat ID, Tijet N, Boutros PC, Korkalainen M. Toxicological implications of polymorphisms in receptors for xenobiotic chemicals: the case of the aryl hydrocarbon receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, 207(2 Suppl):43-51.
- 60] Lin JH. and Lu AYH. Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications. *Clinical Pharmacokinetics*, 1998, 35:361-390.
- 61] Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A, Papakosta S, Asproдини EK. In vivo evaluation of CYP1A2, CYP2A6, NAT-2 and xanthine oxidase activities in a Greek population sample by the RP-HPLC monitoring of caffeine metabolic ratios. *Biomedical Chromatography*, 2007,21:190-200.
- 62] Sinha R. and Rothman N. Role of well-done, grilled meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer. *Cancer Letters*, 1999, 143:189-194.
- 63] Vistisen K, Loft S, Poulsen HE. Cytochrome P4501A2 activity in man measured by caffeine metabolism: effect of smoking, broccoli and exercise. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1991, 283: 407-411.
- 64] Vistisen K, Poulsen HE, Loft S. Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine. *Carcinogenesis*,1991, 13: 1561-1568.
- 65] Rasmussen BB, Nielsen TL, Brosen K. Fluvoxamine is a potent inhibitor of the metabolism of caffeine in vitro. *Pharmacology and Toxicology*, 1998, 83:240-245.
- 66] Loi C-M, Parker BM, Cusack BJ, Vestal RE. Individual and combined effects of cimetidine and ciprofloxacin on the theophylline metabolism in male nonsmokers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1993, 36: 195-200.
- 67] Fuhr U, Woodcock BG, Siewert M. Verapamil and drug metabolism by the cytochrome P450 isoform CYP1A2. *European Journal of Clinical Pharmacology*,1992, 42: 463-464.
- 68] Fuhr U, Anders EM, Mahr G, Sörgel F, Staib AH. Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P450IA2 activity in vivo and in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1992, 36: 942-948.

- 69] Fuhr U. and Kummert AL. The fate of maringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1995, 58: 365-373.
- 70] Le Marchand L, Franke AA, Custer L, Wilkens LR, Cooney RV. Lifestyle and nutritional correlates of cytochrome CYP1A2 activity: inverse associations with plasma lutein and alpha-tocopherol. *Pharmacogenetics*, 1997, 7: 11-19.
- 71] Kalow W. and Tang B-K. The use of caffeine for enzyme assays: a critical appraisal. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1993, 53:503-514.
- 72] Pollock BG, Wylie M, Stack JA, Sorisio DA, Thompson DS, Kirshner MA. Inhibition of caffeine metabolism by estrogen replacement therapy in postmenopausal women. *Journal of Clinical Pharmacology*, 1999, 39: 936-940.
- 73] Lelouet H, Bechtel YC, Paitaud G, Brientini MP, Miguët JP, Bechtel P.R. Caffeine metabolism in a group of 67 patients with primary biliary cirrhosis. *International Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2001, 39: 25-32.
- 74] Tsutsumi K, Kotegawa T, Matsuki S, Tanaka Y, Ishii Y, Kodama Y. The effect of pregnancy on cytochrome P4501A2, xanthine oxidase, and N-acetyltransferase activities in humans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2001, 70: 121-125.
- 75] Carrillo JA. and Benitez J. Caffeine metabolism in a healthy Spanish population: N-acetylator phenotype and oxidation pathways. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1994, 55 : 293-304.
- 76] Relling MV, Lin J-S, Ayers GD, Evans WE. Racial and gender differences in N-acetyltransferase, xanthine oxidase, and CYP1A2 activities. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1992, 52: 643-658.
- 77] Bebia Z, Buch S, Wilson J, Frye R, Romkes M, Cecchetti A. Bioequivalence revisited: Influence of age and sex on CYP enzymes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2004, 76: 618-627.
- 78] Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM. The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 199: 193-209.
- 79] Jiang Z, Dragin N, Jorge-Nebert LF, Martin MV, Guengerich FP, Aklillu E, et al. Search for an association between the human CYP1A2 genotype and CYP1A2 metabolic phenotype. *Pharmacogenetic and Genomics*, 2006, 16:359-367.
- 80] <http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm>; προσπελάστηκε 26/7/2016.
- 81] Sachse C, Bhambra U, Smith G, Lightfoot TJ, Barrett JH, Scollay J. Colorectal Cancer Study Group. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in

- colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. *British Journal Clinical Pharmacology*, 2003, 55: 68-76.
- 82] Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, Kinoshita M, Funayama M, Kamataki T. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. *Journal of Biochemistry*, 1999, 125: 803-808.
- 83] Han X-M, Ouyang D-S, Chen X-P, Shu Y, Jiang C-H, Tan Z-R, et al. Inducibility of CYP1A2 by omeprazole *in vivo* related to the genetic polymorphism of CYP1A2. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2002, 5: 540-543.
- 84] Tao L, Xiang YB, Chan KK, Wang R, Gao YT, Yu MC, Yuan JM. Cytochrome P450A2 phenotype and bladder cancer risk: The Shanghai bladder cancer study. *International Journal of Cancer*, 2012, 130(5): 1174-1183.
- 85] Vistisen K, Loft Olsen JH, Vallentin S, Ottesen S, Hirsch FR. Low CYP1A2 activity associated with testicular cancer. *Carcinogenesis*, 2004, 25: 923-929.
- 86] Hong C-C, Tang B-K, Rao V, Agarwal S, Martin L, Tritchler D. Cytochrome P450A2 (CYP1A2) activity, mammographic density, and oxidative stress: a cross-sectional study. *Breast Cancer Research*, 2004, 6: R338-R351.
- 87] Di YM, Chow VD, Yang LP, Zhou SF. Structure, function, regulation and polymorphism of human cytochrome P450 2A6. *Current Drug Metabolism*, 2009, 10(7): 754-780.
- 88] Pelkonen O, Rautio A, Raunio H, Pasanen M. CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology*, 2000, 144: 139-147.
- 89] Messina ES, Tyndale RF, Sellers EM. A major role for CYP2A6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1997, 282: 1608-1614.
- 90] Oscarson M. Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) gene: implications for interindividual differences in nicotine metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 2001, 29: 91-95.
- 91] Thornton-Manning J, Appleton ML, Gonzalez FJ, Yost GS. Metabolism of 3-methylindole by vaccinia-expressed P450 enzymes: correlation of 3-methyleneindolenine formation and protein-binding. *Pharmacology Experimental Therapeutics*, 1996, 276: 21-29.
- 92] Yamazaki H, Inui Y, Yun CH, Guengerich FP, Shimada T. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis*, 1992, 13: 1789-1794.

- 93] Camus AM, Geneste O, Honkakoski P, Bereziat JC, Henderson CJ, Wolf CR. High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Molecular Carcinogenesis*, 1993, 7: 268-275.
- 94] Sotaniemi EA, Rautio A, Backstrom M, Arvela P, Pelkonen O. CYP3A4 and CYP2A6 activities marked by the metabolism of lignocaine and coumarin in patients with liver and kidney diseases and epileptic patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1995, 39: 71-76.
- 95] Benowitz N.L, Peng M, Jacob III P. Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on chlorzoxazone and caffeine metabolism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2003, 74: 468-474.
- 96] Pavek P. and Dvorak, Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Current Drug Metabolism*, 2008, 9:129-143.
- 97] Kirby GM, Wolf CR, Neal GE, Judah DJ, Henderson CJ, Srivatanakul P. In vitro metabolism of aflatoxin B1 by normal and tumorous liver tissue from Thailand. *Carcinogenesis*, 1993, 14: 2613-2620.
- 98] Nowell S, Sweeney C, Hammons G, Kadlubar FF, Lang NP. CYP2A6 activity by caffeine phenotyping: association with colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2002 ,11: 377-383.
- 99] Raunio H. and Rahnasto-Rilla M. CYP2A6: genetics, structure, regulation, and function. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 2012, 27(2): 73-88.
- 100] Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biology & Medicine*, 2002, 33: 774-797.
- 101] Guercioli R, Szumlanski C, Weinshilboum RM. Human liver xanthine oxidase: nature and extent of individual variation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1991, 50: 663-672.
- 102] Levartovsky D, Lagziel A, Sperling O, Liberman U, Yaron M, Hosoya T. XDH gene mutation is the underlying cause of classical xanthinuria: A second report. *Kidney International*, 2000, 57:2215–2220.
- 103] Stryer L. Βιοχημεία. 2η Έκδοση, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997, 617: 673-674.
- 104] Kooij A, Schijns M, Frederiks WM, Van Noorden CJ, James J. Distribution of xanthine oxidoreductase activity in human tissues-a histochemical and biochemical study. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology*, 1992, 63: 17-23.

- 105] Aranda R, Domenech E, Rus A-D, Real JT, Sastre J, Vina J. Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free Radical Research*, 2007, 41: 1195-1200.
- 106] Atmane N, Dairou J, Paul A, Dupret J-M, Rodrigues-Lima F. Redox regulation of the human xenobiotic metabolizing enzyme Arylamine N-acetyltransferase 1 (NAT1). *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278: 35086-35092.
- 107] Boukouvala S. and Sim E. Structural analysis of the genes for human arylamine N-acetyltransferases and characterisation of alternative transcripts. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2005, 96: 343-351.
- 108] Mitchell KR. and Warshawsky D. Xenobiotic inducible regions of the human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2 genes. *Toxicology Letters*, 2003, 139: 11-23.
- 109] Evans DA. N-acetyltransferase. *Pharmacology & Therapeutics*, 1989, 42: 157-234.
- 110] Okumura K, Tomoko K, Chikazawa S, Komada F, Iwakawa S, Tanigawara Y. Genotyping of N-acetylation polymorphism and correlation with procainamide metabolism. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 1997, 61: 509-517.
- 111] Gross M, Kruisselbrink T, Anderson K, Lang N, McGovern P, Delongchamp R. Distribution and concordance of N-acetyltransferase genotype and phenotype in an American population. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 1999, 8: 683-692.
- 112] Dupret JM. and Rodrigues-Lima F. Structure and regulation of the drug-metabolizing enzymes arylamine N-acetyltransferases. *Current Medicinal Chemistry*, 2005, 12(3): 311-318.
- 113] Rodrigues-Lima F, Dairou J, Dupret JM. Effect of environmental substances on the activity of arylamine N-acetyltransferases. *Current Drug Metabolism*, 2008, 9(6):505-9.
- 114] Sim E, Fakis G, Laurieri N, Boukouvala S. Arylamine N-acetyltransferases—from drug metabolism and pharmacogenetics to identification of novel targets for pharmacological intervention. *Advances in Pharmacology*, 2012, 63: 169-205.
- 115] http://nat.mbg.duth.gr/Human%20NAT2%20alleles_2013.htm#_ftnnotes, last updated 18/4/2016; Προσπελάστηκε την 11/6/2016).
- 116] Yuan JM, Chan KK, Coetzee GA, Castelao JE, Watson MA, Bell DA, Wang R, Yu MC. Genetic determinants in the metabolism of bladder carcinogens in relation to risk of bladder cancer. *Carcinogenesis*, 2008, 29(7): 1386-1393.
- 117] Hein. DWN-Acetyltransferase genetics and their role in predisposition to aromatic and heterocyclic amine-induced carcinogenesis. *Toxicology Letters*, 2000, 112-113: 349-356.
- 118] Voutsinas J, Wilkens LR, Franke A, Vogt TM, Yokochi LA, Decker R, Le Marchand L. Heterocyclic amine intake, smoking, cytochrome P450 1A2 and N-acetylation

- phenotypes, and risk of colorectal adenoma in a multiethnic population. *Gut*, 2013, 62(3): 416-422.
- 119] Fisher MB, Vandenbranden M, Findlay K, Burchell B, Thummel KE, Hall SD, Wrighton SA. Tissue distribution and interindividual variation in human UDP-glucuronosyltransferase activity: relationship between UGT1A1 promoter genotype and variability in a liver bank. *Pharmacogenetics*, 2000, 10(8): 727-739.
- 120] <http://www.genenames.org/cgi-bin/genefamilies/set/363>, προσπελάστηκε 11/7/2016).
- 121] Stillwell WG, Turesky RJ, Sinha R, Skipper PL, Tannenbaum SR. Biomonitoring of heterocyclic aromatic amine metabolites in human urine. *Cancer Letters*, 1999,143(2):145-148.
- 122] Burchell B, Lockley DJ, Staines A, Uesawa Y, Coughtrie MW. Substrate specificity of human hepatic udp-glucuronosyltransferases. *Methods Enzymology*, 2005, 400: 46-57.
- 123] Marshal, I W. Κλινική Βιοχημεία. 3^η Έκδοση, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, 1998, pp. 98-101.
- 124] Malfatti MA. and Felton JS. N-glucuronidation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and N-hydroxy-PhIP by specific human UDP-glucuronosyltransferases. *Carcinogenesis*, 2001, 22(7): 1087-1093.
- 125] King CD, Rios GR, Assouline JA, Tephly TR. Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1999, 365(1): 156-162.
- 126] Bock KW. and Köhle C. UDP-glucuronosyltransferase 1A6: structural, functional, and regulatory aspects. *Methods in Enzymology*, 2005, 400, pp.57-75.
- 127] Mackenzie PI, Rodbourn L, Iyanagi T. Glucuronidation of carcinogen metabolites by complementary DNA-expressed uridine 5'-diphosphate glucuronosyltransferases. *Cancer Research*, 1993, 53(7): 1529-1533.
- 128] Gurley BJ, Gardner SF, Hubbard MA, Williams DK, Gentry WB, Carrier J, Khan IA, Edwards DJ, Shah A. In vivo assessment of botanical supplementation on human cytochrome P450 phenotypes: Citrus aurantium, Echinacea purpurea, milk thistle, and saw palmetto. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2004 ,76(5): 428-440.
- 129] Maliakal PP. and Wanwimolruk S. Effect of herbal teas on hepatic drug metabolizing enzymes in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2001, 53(10): 1323-1329.
- 130] Debersac P, Vernevauf MF, Amiot MJ, Suschetet M, Siess MH. Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, 2001, 39(2): 109-117.

- 131] Wenk M, Todesco L, Krähenbühl S. Effect of St John's wort on the activities of CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, N-acetyltransferase 2, and xanthine oxidase in healthy males and females. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2004, 57(4): 495-499.
- 132] Fuhr U, Klittich K, Staib AH. Inhibitory effect of grapefruit juice and its bitter principal, naringenin, on CYP1A2 dependent metabolism of caffeine in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1993, 35(4): 431-436.
- 133] Lampe JW, King IB, Li S, Grate MT, Barale KV, Chen C, Feng Z, Potter JD. Brassica vegetables increase and apiaceous vegetables decrease cytochrome P450 1A2 activity in humans: changes in caffeine metabolite ratios in response to controlled vegetable diets. *Carcinogenesis*, 2000, 21(6): 1157-1162.
- 134] Begas E, Tsioutsouliti A, Kouvaras E, Haroutounian SA, Kasiotis KM, Kouretas D, Asprodini E. Effects of peppermint tea consumption on the activities of CYP1A2, CYP2A6, Xanthine Oxidase, N-acetyltransferase-2 and UDP-glucuronosyltransferases-1A1/1A6 in healthy volunteers. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 100: 80-89.
- 135] Chen Y, Xiao P, Ou-Yang DS, Fan L, Guo D, Wang YN, Han Y, Tu JH, Zhou G, Huang YF, Zhou HH. Simultaneous action of the flavonoid quercetin on cytochrome P450 (CYP) 1A2, CYP2A6, N-acetyltransferase and xanthine oxidase activity in healthy volunteers. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 2009, 36(8): 828-833.
- 136] Xiao J, Huang WH, Peng JB, Tan ZR, Ou-Yang DS, Hu DL, Zhang W, Chen Y. Quercetin significantly inhibits the metabolism of caffeine, a substrate of cytochrome P450 1A2 unrelated to CYP1A2*1C (-2964G>A) and *1F (734C>A) gene polymorphisms. *Biomed Research International*, 2014, 40: 50-71.
- 137] Zheng J, Chen B, Jiang B, Zeng L, Tang ZR, Fan L, Zhou HH. The effects of puerarin on CYP2D6 and CYP1A2 activities in vivo. *Archives Pharmacol Research*, 2010, 33(2): 243-246.
- 138] Chen Y, Xiao CQ, He YJ, Chen BL, Wang G, Zhou G, Zhang W, Tan ZR, Cao S, Wang LP, Zhou HH. Genistein alters caffeine exposure in healthy female volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2011, 67(4): 347-353.
- 139] Volak LP, Hanley MJ, Masse G, Hazarika S, Harmatz JS, Badmaev V, Majeed M, Greenblatt DJ, Court MH. Effect of a herbal extract containing curcumin and piperine on midazolam, flurbiprofen and paracetamol (acetaminophen) pharmacokinetics in healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2013, 75(2): 450-62.
- 140] Ghotbi R, Christensen M, Roh HK, Ingelman-Sundberg M, Aklilu E, Bertilsson L. Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-

- phenotype relationship in Swedes and Koreans. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2007, 63(6): 537-546.
- 141] Perera V, Gross AS, McLachlan AJ. Caffeine and paraxanthine HPLC assay for CYP1A2 phenotype assessment using saliva and plasma. *Biomedical Chromatography*, 2010, 24(10): 1136-44.
- 142] Djordjevic N, Carrillo JA, Gervasini G, Jankovic S, Aklillu E. In vivo evaluation of CYP2A6 and xanthine oxidase enzyme activities in the Serbian population. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 2010, 66(6): 571-578.
- 143] Djordjevic N, Carrillo JA, Roh HK, Karlsson S, Ueda N, Bertilsson L, Aklillu E. Comparison of N-acetyltransferase-2 enzyme genotype-phenotype and xanthine oxidase enzyme activity between Swedes and Koreans. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2012, 52(10): 1527-1534.
- 144] Begas E, Kouvaras E, Tsakalof A.K, Bounitsi M, Asproдини EK. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for CYP1A2 phenotyping by use of a caffeine metabolite ratio in saliva. *Biomedical Chromatography*, 2015, 29(11): 1657-1663.
- 145] Carrillo JA, Christensen M, Ramos SI, Alm C, Dahl M-L, Benitez J. Evaluation of Caffeine as an *In Vivo* Probe for CYP1A2 Using Measurements in Plasma, Saliva, and Urine. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2000, 22: 409-417.
- 146] Gu L, Gonzales FJ, Kalow W, Tang BK. Biotransformation of caffeine, paraxanthine, theobromine, and theophylline by c-DNA-expressed human CYP1A2 and CYP2E1. *Pharmacogenetics*, 1992, 2: 73-77.
- 147] Arnaud MJ. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 2011, 200: 33-91.
- 148] Grant DM, Tang BK, Campbell ME, Kalow W. Effect of allopurinol on caffeine disposition in man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1986 21: 454-458.
- 149] Tang BK, Grant DM, Kalow W. Isolation and identification of 5-acetyl-amino-6-formylamino-3-methyluracil as a major metabolite of caffeine in man. *Drug Metabolism and Disposition*, 1983, 11: 218-220.
- 150] Lelo A, Kjellen G, Birkett DJ, Miners JO. Paraxanthine metabolism in humans: determination of metabolic partial clearances and effects of allopurinol and cimetidine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1989, 248: 315-319.
- 151] Fuhr U. and Rost KL. Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva. *Pharmacogenetics*, 1994, 4(3): 109-116.
- 152] Campbell ME, Spielberg SP, Kalow W. A urinary metabolite ratio that reflects systemic caffeine clearance. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1987, 42(2): 157-165.

- 153] Rostami-Hodjegan A, Nurminen S, Jackson PR, Tucker GT. Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics*, 1996, 6:121-149.
- 154] McGill MR. and Jaeschke H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. *Pharmaceutical Research*, 2013, 30(9): 2174-2187.
- 155] Bock K.W, Schrenk D, Forster A, Griese EU, Mörike K, Brockmeier D, Eichelbaum M. The influence of environmental and genetic factors on CYP2D6, CYP1A2 and UDP-glucuronosyltransferases in man using sparteine, caffeine, and paracetamol as probes. *Pharmacogenetics*, 1994, 4(4): 209-218.
- 156] Wong P, Villeneuve G, Tessier V, Banerjee K, Nedev H, Jean-Claude BJ. Stability of 5-acetamido-6-formylamino-3-methyluracil in buffers and urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, 28: 693–700.
- 157] <http://olympoubotana.gr>
- 158] de Waard PW, Peijnenburg AA, Baykus H, Aarts JM, Hoogenboom RL, van Schooten FJ, de Kok TM. A human intervention study with foods containing natural Ah-receptor agonists does not significantly show AhR-mediated effects as measured in blood cells and urine. *Chemico- Biological Interaction*, 2008, 176(1): 19-29.
- 159] Martins N, Barros L, Santos-Buelga C, Henriques M, Silva S, Ferreira IC. Evaluation of bioactive properties and phenolic compounds in different extracts prepared from *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 2015, 170: 378-385.
- 160] European Medicines Agency. Evaluation of Medicines for Human Use. Assessment report on *Sideritis scardica* Griseb.; *Sideritis clandestina* (Bory & Chaub.) Hayek; *Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr.; *Sideritis syriaca* L., herba, EMA/HMPC/39455/2015, 2 February 2016.
- 161] Lee KJ, Woo ER, Choi CY, Shin DW, Lee DG, You HJ, Jeong HG. Protective effect of acteoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Life sciences*, 2004, 9: 1051-64.
- 162] Buening MK, Chang RL, Huang MT, Fortner JG, Wood AW, Conney AH. Activation and inhibition of benzo(a)pyrene and aflatoxin B1 metabolism in human liver microsomes by naturally occurring flavonoids. *Cancer Research*, 1981, 41(1): 67-72.
- 163] Kim HJ, Lee SB, Park SK, Kim HM, Park YI, Dong MS. Effects of hydroxyl group numbers on the B-ring of 5, 7-dihydroxyflavones on the differential inhibition of human CYP 1A and CYP1B1 enzymes. *Archives of pharmacol research*, 2005, 28: 1114-21.

- 164] Lee H, Wang H, Su HY, Hao NJ. The structure-activity relationships of flavonoids as inhibitors of cytochrome P-450 enzymes in rat liver microsomes and the mutagenicity of 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline. *Mutagenesis*, 1994, 9: 101-6.
- 165] Lee H, Yeom H, Kim YG, Yoon CN, Jin C, Choi JS, Kim BR, Kim DH. Structure-related inhibition of human hepatic caffeine N3-demethylation by naturally occurring flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 1998, 55(9): 1369-1375.
- 166] von Moltke LL, Weemhoff JL, Bedir E, Khan IA, Harmatz JS, Goldman P, Greenblatt DJ. Inhibition of human cytochromes P450 by components of Ginkgo biloba. *The journal of pharmacy and pharmacology*, 2004, 56(8):,1039-44.
- 167] Jian TY, He JC, He GH, Feng EF, Li HL, Bai M, Xu GL. Scutellarin inhibits cytochrome P450 isoenzyme 1A2 (CYP1A2) in rats. *Phytotherapy research*, 2012, 26: 1226-30.
- 168] McLean A, and Driver H.E. Combined effects of low doses of DDT and Phenobarbital on cytochrome P450 and amidopyrine demethylation. *Biochemical Pharmacology* 1977,26: 1299-1302.
- 169] di Gesso JL, Kerr JS, Zhang Q, Raheem S, Yalamanchili SK, O'Hagan D, Kay C., O'Connell MA. Flavonoid metabolites reduce tumor necrosis factor- α secretion to a greater extent than their precursor compounds in human THP-1 monocytes. *Molecular nutrition and food research*, 2015, 59: 1143-54.
- 170] Si D, Wang Y, Zhou YH, Guo Y, Wang J, Zhou H, Li ZS, Fawcett JP. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 2009, 37: 629-34.
- 171] Grant DM, Tang BK, Kalow W. Variability in caffeine metabolism. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1983, 33: 591-602.
- 172] Nakajima M, Itoh M, Yamanaka H, Fukami T, Tokudome S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Yokoi T. Isoflavones inhibit nicotine C-oxidation catalyzed by human CYP2A6. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2006, 46(3): 337-344.
- 173] Prasopthum A, Pouyfung P, Sarapusit S, Srisook E, Rongnoparut P. Inhibition effects of Vernonia cinerea active compounds against cytochrome P450 2A6 and human monoamine oxidases, possible targets for reduction of tobacco dependence. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2015, 30(2): 174-181.
- 174] Tiong KH, Yiap BC, Tan EL, Ismail R, Ong CE. In vitro modulation of naturally occurring flavonoids on cytochrome P450 2A6 (CYP2A6) activity. *Xenobiotica*, 2010, 40(7): 458-66.

- 175] Kato M, Morikawa A, Kimura H, Shimizu T, Nakano M, Kuroume T. Effects of antiasthma drugs on superoxide anion generation from human polymorphonuclear leukocytes or hypoxanthine-xanthine oxidase system. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1991, 96: 128-133.
- 176] Saugstad OD. Role of xanthine oxidase and its inhibitor in hypoxia: reoxygenation injury. *Pediatrics*, 1996, 98: 103-107.
- 177] Renton KW. and Knickle LC. Regulation of hepatic cytochrome P450 during infectious disease. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1990, 68:777-781.
- 178] Nguyen MT, Awale S, Tezuka Y, Tran QL, Watanabe H, Kadota S. Xanthine oxidase inhibitory activity of Vietnamese medicinal plants. *Biological and Pharmacology Bulletin*, 2004, 27(9): 1414-1421.
- 179] Lin WQ, Xie JX, Wu XM, Yang L, Wang HD. Inhibition of xanthine oxidase activity by gnaphalium affine extract. *Chinese medical sciences journal*, 2014, 29: 225-30.
- 180] Tuzun BS, Hajdu Z, Orban-Gyapai O, Zomborszki ZP, Jedlinszki N, Forgo P, Kivcak B, Hohmann J. Isolation of Chemical Constituents of *Centaurea virgata* Lam. and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity of the Plant Extract and Compounds. *Medicinal chemistry*, 2017, 13: 498-502.
- 181] Kukongviriyapan V, Phromsopha N, Tassaneeyakul W, Kukongviriyapan U, Sripa B, Hahnvajjanawong V, Bhudhisawasdi V. Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2. *Xenobiotica*, 2006, 36(1): 15-28.
- 182] Moore LE, Baris DR, Figueroa JD, Garcia-Closas M, Karagas MR, Schwenn MR, Johnson, AT, Lubin JH, Hein DW, Dagnall CL, Colt JS, Kida M, Jones MA, Schned AR, Cherala SS, Chanock SJ, Cantor KP, Silverman DT, Rothman N. GSTM1 null and NAT2 slow acetylation genotypes, smoking intensity and bladder cancer risk: results from the New England bladder cancer study and NAT2 meta-analysis. *Carcinogenesis*, 2011, 32(2): 182-189.
- 183] Walle UK. and Walle T. Induction of human UDP-glucuronosyltransferase UGT1A1 by flavonoids-structural requirements. *Drug Metabolism and Disposition*, 2002, 30(5):564-569.
- 184] Ma GY, Cao YF, Hu CM, Fang ZZ, Sun XY, Hong M, Zhu ZT. Comparison of inhibition capability of scutellarein and scutellarin towards important liver UDP-glucuronosyltransferase (UGT) isoforms. *Phytotherapy research*, 2014, 28: 382-6.